Schweizerisches Tropeninstitut, Basel,
und Zoologische Anstalt der Universität Basel

Parasitologische und immunbiologische Untersuchungen über die durch *Dipetalonema viteae* erzeugte Nagetierfilariose

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Würde eines Doktors der Philosophie
vorgelegt der Philosophisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität Basel

von

Niklaus Weiss

von Basel und Bettingen

Basel 1970

Verlag für Recht und Gesellschaft AG., Basel

Genehmigt von der Philosophisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät auf Antrag der Herren Professoren Dr. R. Geigy und Dr. A. Aeschlimann.

Basel, den 30. Juni 1970

Prof. Dr. S. Fallab
Dekan

Separatdruck aus Acta Tropica Bd. XXVII, Heft 3, 1970

Meinen lieben Eltern
gewidmet

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Parasitologische und immunbiologische Untersuchungen über die durch *Dipetalonema viteae* erzeugte Nagetierfilariose

Inhaltsverzeichnis

Einleitung 220

Material und Methoden 221

1. Material 221

2. Methoden 221
   2.1. Haltung und Infektion des Zwischenwirtes 221
   2.2. Infektion und Kontrolle des Hauptwirtes 221
   2.3. Mf-Injektionen, Filarientransplantationen und *in vitro*-Versuche . 222
   2.4. Splenektomie 222

Resultate 222

1. Hauptwirte für *D. viteae* 222

2. Infektionsraten 223

3. Infektionsverlauf von *D. viteae* bei *M. libycus*, beim *Hamster* und bei *G. hirtipes* 224
   3.1. Die Präpatenzzeit 224
   3.2. Verlauf und Dauer der Mikrofilarämie 225
   Zusammenfassung von Kapitel 3 229

4. Lebensdauer und Verteilung der Filarien im Wirtskörper 232
   4.1. Lebensdauer der Filarien 232
   4.2. Verteilung der Filarien im Wirtskörper 233

5. Die Entwicklungsraten 234

6. Beziehungen zwischen Mikrofilarien und den Wirten *M. libycus* und *Hamster* 236
   6.1. Mikrofilarien im Wirtsorganismus 236
   6.2. Diaplacentäre Übertragung von Mikrofilarien 237
   6.3. Injektionsversuche mit Mikrofilarien 238
   Zusammenfassung und Besprechung von Kapitel 6 247

7. Untersuchungen über die Immunität von *M. libycus* und *Hamster* gegenüber den Mikrofilarien 248
   7.1. Filarientransplantationen 248
   7.2. Splenektomie von Immuntieren 250
   7.3. Mf-Injektionen in Immuntiere 251
   7.4. Versuche mit Filarien *in vitro* 252
   Zusammenfassung und Besprechung von Kapitel 7 254

Literatur 256
Résumé 258
Summary 258

Einleitung

BALTAZARD et al. (1953) haben die Haltung einer «nouvelle filaire de laboratoire» beschrieben. Es handelt sich dabei um die von CHABAUD (1952) in der Wüstenratte *Meriones libycus* entdeckten Filarie *Dipetalonema blanci.* Später hat es sich gezeigt, daß diese neue Art mit der 1933 von KREPKOGORSKAJA beschriebenen Filarie *Litomosa wite* aus *Rhombomys opimus* identisch ist. Seither ist der Name *Dipetalonema viteae* gültig. Englische Autoren verwenden *D. witei* als Schreibweise. Die systematische Stellung von *D. viteae* ist noch nicht sicher abgeklärt. Nach YEH (1957) gehört dieser Parasit zur Gattung *Monigofilaria.*

Bis heute sind nur wenige Studien über *D. viteae* veröffentlicht worden. Angaben über den Lebenszyklus dieser Art, bei welcher die Lederzecke *Ornithodorus tartakovskyi* und die Schildzecke *Rhipicephalus* spec. Zwischenwirte sind, stammen von CHABAUD (1954). BAIN (1967) hat die larvale Entwicklung in *O. tartakovskyi* und *O. erraticus* untersucht. TERRY et al. (1961) haben Geschlechtsorgane, Gametogenesis und Entwicklung der Mikrofilarien beschrieben. Eine Infektion durch transplacentäre Übertragung der Mikrofilarien von infizierten Weibchen auf ihre Jungen haben wir im Laboratorium beobachtet (GEIGY, AESCHLIMANN & WEISS, 1967). 1967 habe ich in Zusammenarbeit mit dem Institut Pasteur de l'Iran Feldforschungen im Iran durchgeführt. Bei diesen epidemiologischen Untersuchungen sind *Meriones persicus* als neuer Hauptwirt und *Ornithodorus erraticus sonuraï* als Überträger entdeckt worden (CHAMSA & WEISS, 1969).

Zur Prüfung potentieller filaricider Substanzen in chemotherapeutischen Untersuchungen eignen sich besonders Laborinfektionen mit der Baumwollrattenfilarie, *Litomosoides carinii,* und den Filarien des Hundes, *Dirofilaria immitis* und *D. repens.* Die Haltung im Laboratorium sowie die Wirkung bekannter filaricider Substanzen auf *D. viteae* haben WORMS et al. (1961) beschrieben. Vor- und Nachteile von *D. viteae* im Vergleich zu *L. carinii* sind diskutiert worden. Dabei sind die genannten Autoren zu folgenden Schlüssen gelangt: 1. Für großangelegte chemotherapeutische Untersuchungen ist *L. carinii* besser geeignet. 2. Für Demonstrations- und allgemeine parasitologische Studienzwecke im Labor ist *D. viteae L. carinii* vorzuziehen.

Im Rahmen meiner Dissertation bin ich der Frage nachgegangen, wie die Infektion mit *D. viteae* im Hauptwirt verläuft. Ich habe den Infektionsverlauf in zwei Laborwirten, dem *Goldhamster* und *Gerbillus hirtipes,* mit demjenigen im natürlichen Wirt, *Meriones libycus,* verglichen. Dabei habe ich eine Wirtsimmunität gegen Mikrofilarien bei *M. libycus* und beim *Hamster* festgestellt. Diese überraschende Beobachtung hat mein Interesse für Wirt-Mikrofilarien-Beziehungen geweckt, die dann zum Mittelpunkt meiner Untersuchungen geworden sind. Eine kurze, vergleichende Übersicht über den Infektionsverlauf bei *M. libycus* und beim *Hamster* sowie über eine Immunität gegen Mikrofilarien habe ich schon veröffentlicht (WEISS, 1969 a). Serologische Untersuchungen beim *Hamster* sind mit Hilfe der indirekten Immunofluoreszenzmethode durchgeführt worden (WEISS, 1969 b).

Die vorliegende Dissertation ist unter der Anleitung von Herrn Prof. Dr. R. Geigy und Herrn PD Dr. A. Aeschlimann entstanden, denen ich für ihre Anregungen und für ihr stetes Interesse an meiner Arbeit sowie für den Arbeitsplatz am Schweizerischen Tropeninstitut herzlich danke. Außerdem bedanke ich mich bei Herrn Dr. C. Lambert, der mir das Arbeiten in den Laboratorien der CIBA Aktiengesellschaft, Basel, ermöglicht hat, und bei Herrn R. Dufey, der mich in die Methoden eingeführt hat.

Material und Methoden

1. Material

Der Stamm von *D. viteae* ist von CHABAUD (1952) im Iran isoliert worden und wird seit mehreren Jahren in der CIBA AG, Basel, gehalten. Die beiden Stämme, die wir 1967 bei Qaleh-Morghi und Ghasvin (Iran) isoliert haben (vgl. CHAMSA & WEISS, 1969), sind in den Versuchen nicht verwendet worden. Als Zwischenwirte dienen Lederzecken der Art *Ornithodorus tartakovskyi* aus der Zucht des Schweizerischen Tropeninstituts, Basel. Die meisten Wirtstiere stammen aus der Zucht der CIBA AG, Basel.

2. Methoden

Angaben zur Haltung der Filarie *D. viteae* sowie ihres Haupt- und Zwischenwirtes im Laboratorium finden sich in der Arbeit von WORMS et al. (1961). Im großen und ganzen habe ich seine Methoden übernommen. Abänderungen sind untenstehend aufgeführt.

2.1. Haltung und Infektion des Zwischenwirtes

Die Zecken werden bei 26° C und hoher Luftfeuchtigkeit (um 90%) gehalten und alle 2–3 Monate auf Meerschweinchen oder *M. libycus* gefüttert. Die Infektion des Zwischenwirtes erfolgt mittels Blutmahlzeit auf nicht narkotisierten *M. libycus*. Die besten Infektionsergebnisse sind bei einer Mikrofilarämie in der Höhe von 100–300 Mikrofilarien pro 20 mm^3 zu erwarten. Bei höheren Werten sterben viele der infizierten Zecken. Die larvale Entwicklung der Filarien in *O. tartakovskyi* dauert bei 26° C circa 30 Tage. Bis zu 250 Larven entwickeln sich in einer einzigen Zecke. Lebende Larven konnten noch nach $2^1/_2$ Jahren in ihrem Zwischenwirt nachgewiesen werden.

2.2. Infektion und Kontrolle des Hauptwirtes

Die infektiösen Larven aus der Hämolymphe sezierter Zecken werden in physiologischer Kochsalzlösung ausgezählt. Die Nagetiere werden meist durch subcutane (in wenigen Fällen intraperitoneale) Injektion der infektiösen Larven infiziert. Bei Infektion sind *M. libycus* und *Hamster* 50–70 g und *G. hirtipes* 25–30 g schwer. Die Infektionsdosis beträgt meist zwischen 80 und 120 infektiöser Larven III pro Tier für *M. libycus* und *Hamster* und zwischen 60 und 90 für *G. hirtipes*.

Die um 200 μ langen Mikrofilarien[1] im Blut werden mittels Augenpunktion an mit Äther anästhesierten Tieren vierzehntäglich nachgewiesen. Dabei wird das Blut eines dicken Tropfens von 20 mm^3 nach Hämolyse (mit dest. H_2O), Fixierung mit Methanol und Färbung mit Hämatoxylin (Delafield) auf Mf untersucht. Bei negativem Ergebnis wird ein zweiter dicker Tropfen geprüft. Bei hohen Mf-Zahlen wird das Blut mit Natriumcitratlösung auf 1/20 verdünnt.

Zum Nachweis der Filarien im subcutanen Bindegewebe und den Fascien der Muskulatur werden die Tiere getötet und sofort gehäutet. Anschließend werden Peritoneal- und Pleurahöhle auf Filarien untersucht. Das subcutane Fettgewebe, vor allem bei *Hamstern* zu finden, wird in physiologische Kochsalzlösung eingelegt. Nach einiger Zeit treten die Filarien aus.

[1] Mikrofilarien werden im weiteren als Mf bezeichnet.

2.3. Mf-Injektionen, Filarientransplantationen und *in vitro*-Versuche

Bei den Injektionsversuchen mit Mf werden 1–2 ml Blut infizierter *G. hirtipes* mit hoher Mikrofilarämie nach Versetzen mit Natriumcitratlösung und Bestimmung der Mf-Zahl subcutan injiziert. Bei Gewichtszunahme der Tiere werden die bei späteren Kontrollen gemessenen Mf-Werte auf das Injektionsgewicht umgerechnet [2].

Durch Sektion gewonnene adulte Filarien werden nach kurzem Aufenthalt in steriler NaCl-Lösung oder «Schistosomen-Medium» [3] mittels einer Inzision der Haut in der Steißregion implantiert.

In vitro-Versuche habe ich in kleinen Petri-Schalen mit sterilem «Schistosomen-Medium» bei 37° C durchgeführt. Alle Tage werden die Filarien in neues Medium gelegt. Für 2 Filarien pro Petri-Schale werden 5 ml Medium benötigt. Um die tägliche Mf-Produktion zu bestimmen, wird das Medium zentrifugiert (3000 U/min während 10 min) und bis auf 0,5 ml abpipettiert. Nach Aufschütteln des Niederschlages werden 2 Proben von je 10 mm^3 Medium ausgezählt.

2.4. Splenektomie

Die Nager werden intraperitoneal mit Nembutal (0,1 ml/100 g Körpergewicht) narkotisiert. Die Milz wird nach üblicher Methode unter sterilen Kautelen entnommen. Nach beendigter Operation sowie an den beiden folgenden Tagen werden je 10 000 E Penicillin pro 100 g Körpergewicht i.p. injiziert.

Resultate

1. Hauptwirte für D. viteae

Tabelle 1 gibt eine Übersicht über die bis heute in der Natur gefangenen Wüstenrattenarten, die mit *D. viteae* infiziert gewesen sind. Es handelt sich dabei um Nagetiere der Gattungen *Meriones* und *Rhombomys*.

TABELLE 1

Natürliche Wirte für *D. viteae*

Wirt	Fundort	Autor
Rhombomys opimus (Licht. 1823)	Kasakstan	Krepkogorskaja (1933)
Meriones libycus (Licht. 1823)	NO – Iran	Chabaud (1952)
Meriones erythrourus (Gray 1842)	Tadzhikistan	Derlyatko (1962)
Meriones persicus (Blanford 1875)	Iran (Teheran, Ghasvin)	Chamsa & Weiss (1969)

[2] Es wird angenommen, daß das Blutvolumen in bezug auf das Körpergewicht konstant bleibt.

[3] «Schistosomen-Medium» enthält 1000 ml Hanks, 400 ml «Parker 199», 600 ml Kälberserum, 100 E/ml Penicillin und 40 μ/ml Streptomycin (C. R. Lambert, 1966).

Für Laboratoriumsversuche würde man die üblichen Nagetiere, wie Hamster, Mäuse und Ratten, den Wüstenratten vorziehen, da die Zucht der ersteren weit erfolgreicher ist und somit genügend Tiere zur Verfügung stehen. Jedoch sind *Laborratten, weiße Mäuse, Meerschweinchen* sowie *Mastomys coucha* resistent gegen eine Infektion mit *D. viteae* (WORMS et al., 1961; SEN & BHATTACHARYA, 1964). Einzig der *Hamster* läßt nach WORMS et al. (1961) eine erfolgreiche Entwicklung der Filarien zu. BAIN (1967) hat *Meriones shawi* erfolgreich infiziert, und mir ist die Infektion von *M. unguiculatus, M. vinogradovi* sowie von *Gerbillus hirtipes* gelungen.

Das Wirtsspektrum für *D. viteae* umfaßt neben Arten der Unterfamilie der *Gerbillinae* (Wüsten- und Rennmäuse) auch den Goldhamster. Die Empfänglichkeit von *Goldhamster* und *G. hirtipes* entspricht der systematischen Beziehung zu den natürlichen Wirten, werden doch nach SIMPSON (1945) die Gattungen *Mesocricetus, Gerbillus* und *Meriones* zu der Familie der *Cricetidae* (Hamsterähnliche) gerechnet.

2. *Infektionsraten*

M. libycus, Hamster und *G. hirtipes* sind mit infektiösen Larven[4] subcutan injiziert worden. Die sich daraus ergebenden Infektionsraten sind in Tabelle 2 zusammengestellt. Außerdem habe ich 2 *M. persicus* und 2 *M. vinogradovi* sowie 5 von 7 *M. unguiculatus* erfolgreich infiziert.

TABELLE 2

Infektionsraten

	Anzahl infizierter Tiere		erfolgreiche Infektionen von	in %
M. libycus	90		69	76,7
		41 Weibchen	26	63,4
		49 Männchen	43	87,7
Hamster	39		39	100
		18 Weibchen	18	100
		21 Männchen	21	100
G. hirtipes	36		35	97,3
		19 Weibchen	18	94,8
		17 Männchen	17	100

[4] Im weiteren als L III bezeichnet.

Die Infektionsrate für *M. libycus* beträgt 76,7% und ist mit dem von WORMS et al. (1961) gefundenen Wert von 84% vergleichbar. Interessant ist, daß die Infektionsrate bei den männlichen *M. libycus* wesentlich höher liegt als bei den Weibchen. Der Unterschied ist jedoch statistisch nicht signifikant. Solche geschlechtsbedingten Unterschiede sind schon bei anderen Wurminfektionen festgestellt worden[5]. Bei den beiden anderen untersuchten Wirten, dem *Hamster* und dem *G. hirtipes,* sind die Infektionsraten höher als beim natürlichen Wirt und unabhängig von seinem Geschlecht.

3. Infektionsverlauf von D. viteae *bei* M. libycus, *beim* Hamster *und bei* G. hirtipes

3.1. Die Präpatenzzeit

In der Präpatenzzeit, der Zeit von Infektion bis zum Auftreten der ersten Mf, entwickeln sich die L III zu adulten Filarien. CHABAUD (1954) hat einige Angaben über diese Entwicklung publiziert. Ebenso hat er die einzelnen Entwicklungsstadien beschrieben. Sie sind alle im subcutanen Bindegewebe und in den Fascien der Muskulatur zu finden. Etwa 7 Tage nach Infektion häuten sich die L III. Darauf folgt ein rasches Längenwachstum. Die L IV häuten sich zu adulten Filarien vor dem 21. Tag nach der Infektion. Zu diesem Zeitpunkt sind die Männchen 13–15 mm, die Weibchen 15–21 mm lang. Das Längenwachstum wird bis etwa 3 Monate post inf. fortgesetzt. Männliche Filarien können bis zu 4 cm, weibliche bis zu 7 cm lang werden.

Die Länge der Präpatenzzeit bei den verschiedenen Wirten ist in Tabelle 3 aufgeführt. Sie beträgt für den natürlichen Wirt, *M. libycus,*

TABELLE 3

Die Präpatenzzeit von *D. viteae* in *M. libycus, Hamstern* und *G. hirtipes*

Wirt	Präpatenzzeit in Tagen	Autor
M. libycus	ca. 50	CHABAUD (1954)
	42–65	WORMS et al. (1961)
	46–59	WEISS
Hamster	49–57	WEISS
G. hirtipes	51–58	WEISS

[5] Z. B. von TODD & HOLLINGSWORTH (1952) für *Ascaridia galli* beim Huhn. SADUN (1948 und 1951) hat die Beziehungen von Sexualhormonen zur natürlichen Resistenz und zu ihren Wirkungen auf das Wachstum des Parasiten *A. galli* untersucht.

wie für den *Hamster* und den *G. hirtipes* etwa 7–8 Wochen. Die Übereinstimmung der Präpatenzzeit läßt auf eine gleiche Entwicklung des Parasiten in den Laborwirten wie im natürlichen Wirt schließen.

3.2. Verlauf und Dauer der Mikrofilarämie

Etwa 7–8 Wochen post inf. kann eine Mikrofilarämie verschieden langer Dauer beginnen. Nach Worms et al. (1964) erreicht die Mikrofilarämie bei *M. libycus* ungefähr 80 Tage nach Infektion einen Höhepunkt. Es sind zwischen 10 und 800 Mf/mm³ gefunden worden. Die Mikrofilarämie kann bis 15 Monate andauern. Genauere Beobachtungen zum Verlauf der Mikrofilarämie sind nicht beschrieben. In Tabelle 4 werden die Versuchstiere nach der Dauer der Mikrofilarämie sowie nach der bei Sektion gefundenen Anzahl weiblicher Filarien in 5 Gruppen dargestellt.

TABELLE 4

Gruppeneinteilung

Gruppe	Mikrofilarämie	Sektionsbefund
A	keine	keine Filarien
B		nur Filarien eines Geschlechts
C	kürzer als 3 Monate	keine oder eine weibliche Filarie
D		mehr als eine weibliche Filarie
E	länger als 3 Monate	mehr als eine weibliche Filarie

Tiere, deren Sektion vor dem 5. Monat nach Infektion ausgeführt worden ist, können hier nicht berücksichtigt werden.

Meriones libycus: Über die Gruppeneinteilung der infizierten *M. libycus* gibt Abbildung 1 A eine Übersicht. Es können 77 der 90 *M. libycus* berücksichtigt werden. *M. libycus* sind in allen Gruppen vertreten; doch überwiegen in den Gruppen A und C die Weibchen, in den Gruppen B und besonders D und E die Männchen. Die Gruppeneinteilung ist signifikant vom Geschlecht abhängig (χ^2-Test, $\alpha < 5\%$).

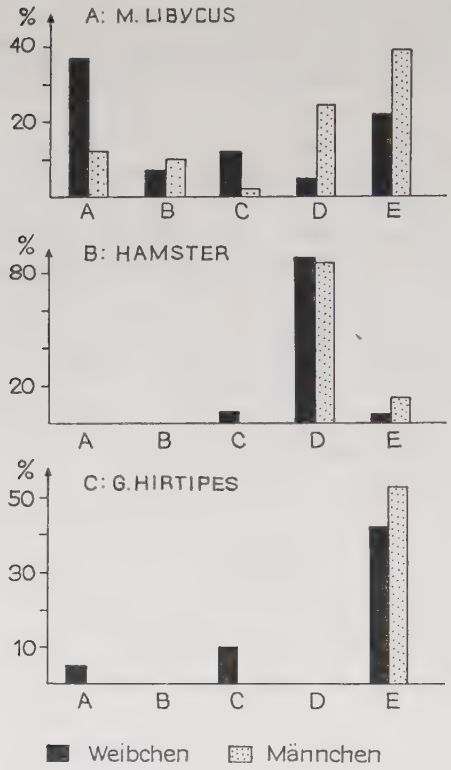

Abb. 1. Nach Geschlecht getrennte Gruppenverteilung bei *M. libycus, Hamstern* und *G. hirtipes* (in % aller infizierten Tiere). Schwarze Säulen: Weibchen, weiße Säulen: Männchen.

Hamster: Bei allen 39 *Hamstern* haben sich aus den L III Filarien entwickelt (Abb. 1 B). In den Gruppen A und B ist kein Tier zu finden. 34 der 39 *Hamster* sind in die Gruppe D einzuordnen. Ein Tier der Gruppe C und 4 Tiere der Gruppe E bilden Ausnahmen vom üblichen Infektionsverlauf.

Gerbillus hirtipes: 35 der 36 *G. hirtipes* sind erfolgreich infiziert worden. 16 *G. hirtipes* sind schon 3 bis 4 Monate nach Infektion seziert worden (da die Filarien als Antigen benötigt worden sind) und kommen für die Gruppeneinteilung nicht in Betracht. Es hat sich gezeigt, daß die Infektion sehr gut angeht. Doch sind alle Tiere 4 bis 7 Monate post inf. gestorben. Einige sind stark abgemagert und manche (auch schwach infizierte) sind an den Hinterbeinen gelähmt gewesen. Ob ein direkter Zusammenhang zur Infektion besteht, ist nicht abgeklärt.

Die Gruppenzugehörigkeit der 20 *G. hirtipes* ist in Abbildung 1 C aufgezeichnet. 17 Tiere fallen in die Gruppe E, eines in die Gruppe A und zwei in die Gruppe C.

3.2.1. *Gruppe A*

Mit Ausnahme eines *G. hirtipes* sind nur *M. libycus* erfolglos infiziert worden. Entsprechend der niederen Infektionsrate für die Weibchen sind in Gruppe A 36,6% aller infizierten Weibchen und nur 23,3% aller Männchen einzuordnen.

3.2.2. *Gruppe B*

Bei 8 von 90 infizierten *M. libycus* sind bis zu 7 Filarien nur eines Geschlechtes gefunden worden. Mf sind keine festgestellt worden. Offenbar können sich Mf nicht parthenogenetisch entwickeln. Untersuchungen über eine Parthenogenese bei Filarien sind mir nicht bekannt.

3.2.3. *Gruppe C*

Die Tiere der Gruppen C und D zeichnen sich durch eine kurze Mikrofilarämie aus, wobei diejenigen der Gruppe C nur eine schwache Mikrofilarämie mit Werten meist unter 10 Mf/20 mm³ (max. 50 Mf/20 mm³) haben. Die Abgrenzung zur Gruppe D ist auf Grund der Sektionsergebnisse durchgeführt. – Bei 6 Tieren lassen sich keine oder nur calzifizierte Filarien nachweisen. Die Calzification und Lysis der Filarien bei beginnender Mf-Produktion ist Grund für die kurze Mikrofilarämie. Bei 2 *M. libycus* und einem *Hamster* ist bei Sektion noch eine lebende weibliche Filarie gefunden worden. Ein Nachweis von Mf ist nur während kurzer Zeit möglich gewesen. Die Ursache der kurzen Mikrofilarämie ist nicht weiter untersucht worden. Möglicherweise sind nur wenige Mf abgegeben worden, die mit der Methode nicht feststellbar gewesen sind.

3.2.4. *Gruppe D*

Tiere, in denen nach einer kurzen Patenzzeit mehr als eine weibliche Filarie gefunden wird, gehören in die Gruppe D. Von den *M. libycus* sind 15,5%, d. h. 12 Männchen und 2 Weibchen, in diese Gruppe eingeteilt. Der Verlauf der Mikrofilarämie und das Sektionsergebnis dreier Tiere zeigt Abbildung 2. 87,2% der infizierten *Hamster* (18 Männchen und 16 Weibchen) haben ebenfalls eine kurze Mikrofilarämie. Abbildung 3 gibt einige Beispiele. – Die Mikrofilarienkurve steigt rasch an. 2 bis 3 Wochen nach Beginn erreicht die Mikrofilarämie ihr Maximum (bis zu 230 Mf/20 mm³ bei *M. libycus* und 420 Mf/20 mm³ bei *Hamstern*). 4 bis 5 Monate post inf. sind keine Mf im peripheren Blut mehr nachweisbar. Bei der Sektion werden aber lebende Filarien (3–32 Weibchen bei *M. libycus* und 11–71 Weibchen bei *Hamstern)* gefunden, die *in vitro* Mf abgeben. Die Tiere dieser Gruppe zeigen ein Immunphänomen gegen Mf, auf das ich im Kapitel 7 eingehen werde.

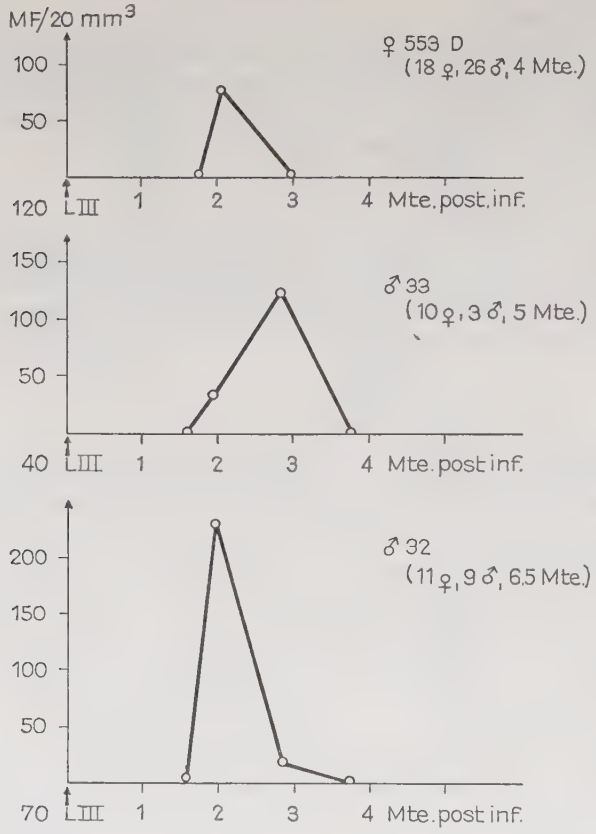

Abb. 2. Gruppe D: Verlauf der Mikrofilarämie bei *M. libycus*. Sektionsbefunde in Klammern.

3.2.5. *Gruppe E*

Beim *M. libycus* dauert die Mikrofilarämie zwischen 6 und 17 Monaten mit einem Mf-Maximum 5 bis 8 Monate nach der Infektion. Bei einem Tier sind bis zu 22 000 Mf/20 mm³ gezählt worden. 31% der infizierten *M. libycus*, 19 Männchen und 9 Weibchen, befinden sich in Gruppe E. Abbildung 4 gibt Beispiele des Mikrofilarämieverlaufes und der Sektionsergebnisse.

Bei 4 *Hamstern* ist die Patenzzeit länger als 3 Monate gewesen. Bei allen sind bakterielle Infektionen, hervorgerufen durch Bißwunden, festgestellt worden, woran zwei Tiere 6 bzw. 7½ Monate post inf. gestorben sind. Vor ihrem Tode sind 1700 bzw. 4500 Mf in 20 mm³ Blut funden worden (Abb. 5 a und b).

17 von 20 *G. hirtipes*, deren Gruppenzugehörigkeit bestimmbar war, befinden sich in dieser Gruppe. Bei den meisten Tieren ist eine

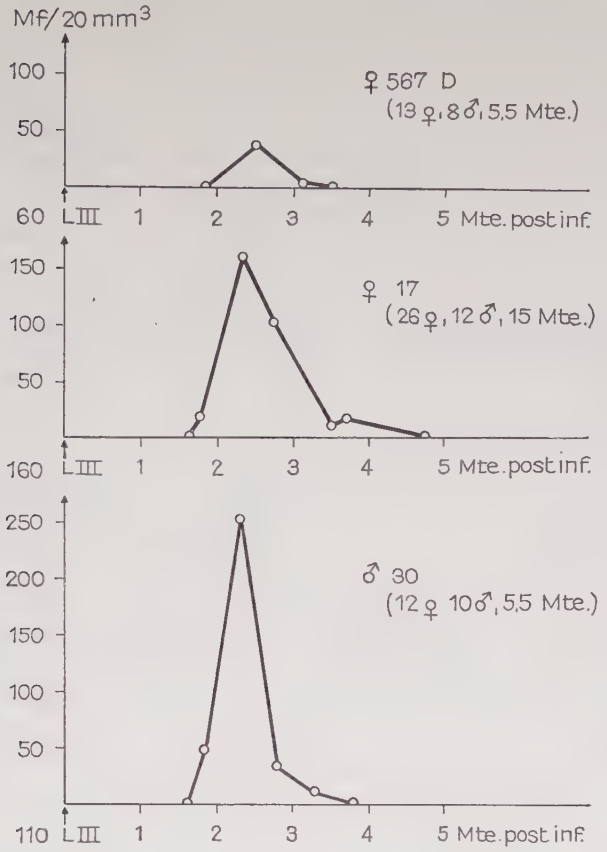

Abb. 3. Gruppe D: Verlauf der Mikrofilarämie beim *Hamster*. Sektionsbefunde in Klammern.

hohe Mikrofilarämie aufgetreten. Bis zu 25 000 Mf/20 mm³ sind gezählt worden. Die Tiere sind jedoch vor dem Absinken der Mf-Kurve (in einem Fall kurz nachher) gestorben. Abbildung 6 zeigt den Infektionsverlauf eines *G. hirtipes* bis zum 7. Monat.

Zusammenfassung von Kapitel 3

Die Dauer der Mikrofilarämie ist bei *M. libycus, Hamstern* und bei *G. hirtipes* untersucht worden. Um die Ergebnisse übersichtlicher darstellen und besser vergleichen zu können, sind 5 Gruppen gebildet worden (Tabelle 4). Eine Gesamtübersicht über die Gruppenzugehörigkeit der 3 Wirte gibt Tabelle 5.

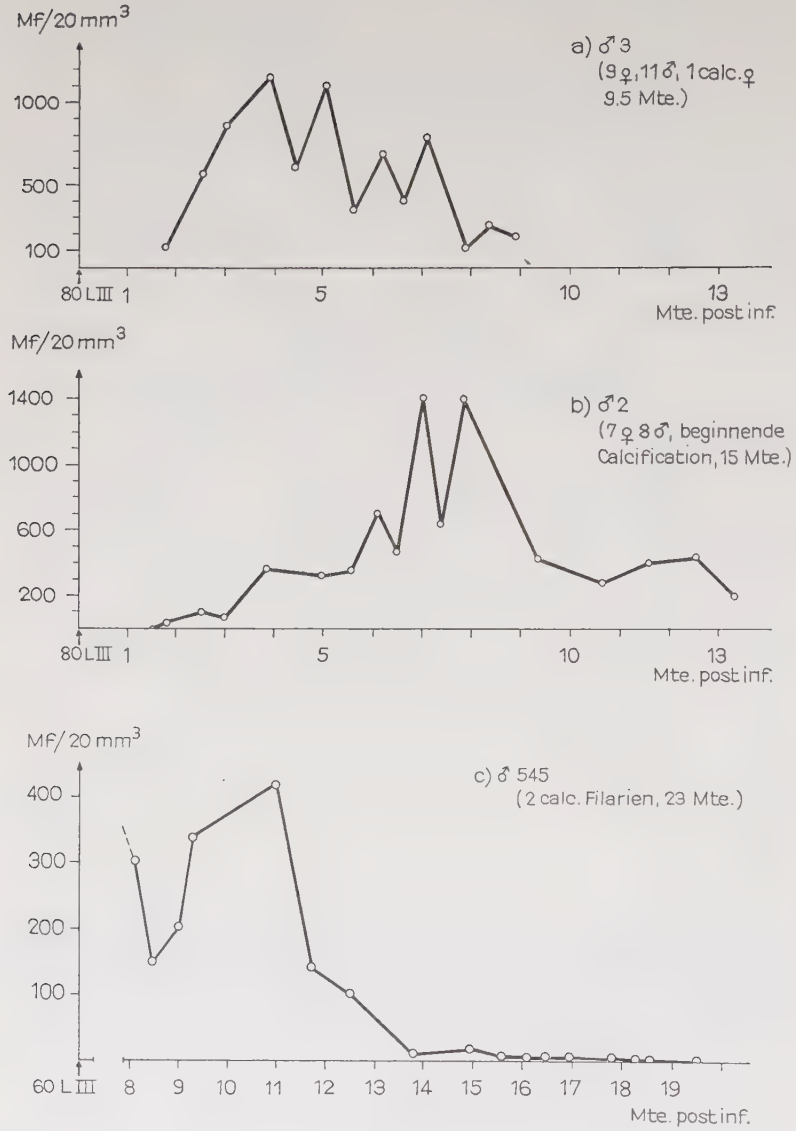

Abb. 4. Gruppe E: Verlauf der Mikrofilarämie bei *M. libycus.* Sektionsbefunde in Klammern.

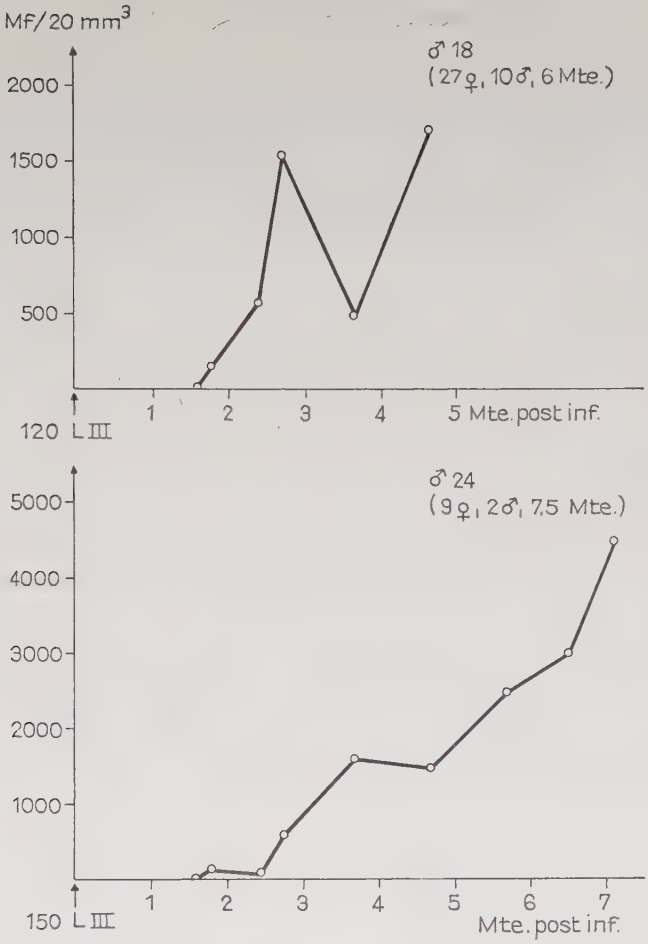

Abb. 5. Gruppe E: Verlauf der Mikrofilarämie beim *Hamster*. Sektionsbefunde in Klammern.

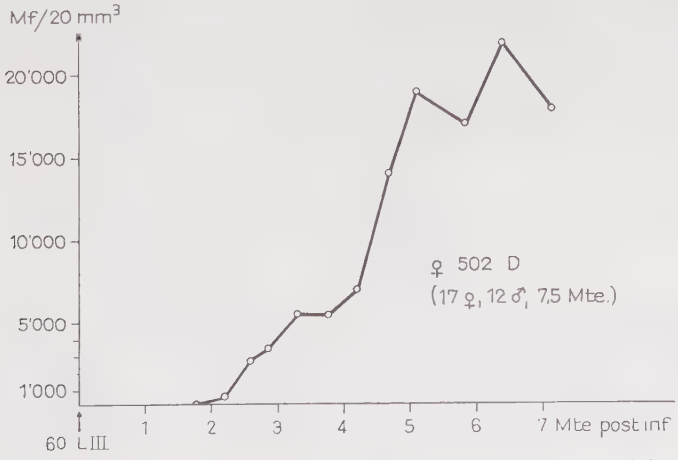

Abb. 6. Gruppe E: Verlauf der Mikrofilarämie bei *G. hirtipes*. Sektionsbefund in Klammern.

TABELLE 5

Gruppenzugehörigkeit von *M. libycus, Hamster* und *G. hirtipes*

Art	Total	Gruppen					
		A	B	C	D	E	unbest.
M. libycus	90	21	8	6	14	28	13
Männchen	49	6	5	1	12	19	6
Weibchen	41	15	3	5	2	9	7
Hamster	39	0	0	1	34	4	0
Männchen	21	0	0	0	18	3	0
Weibchen	18	0	0	1	16	1	0
G. hirtipes	36	1	0	2	0	17	16
Männchen	17	0	0	0	0	9	8
Weibchen	19	1	0	2	0	8	8

Eine vergleichende Betrachtung der Ergebnisse führt zu folgenden Schlüssen:

1. *M. libycus,* der natürliche Wirt für *D. viteae,* ist in allen Gruppen anzutreffen. Die Gruppenverteilung ist im Gegensatz zum *Hamster* und *G. hirtipes* geschlechtsabhängig. Die Infektion verläuft bei den Männchen erfolgreicher als bei den Weibchen. Bei 65,3% der Männchen im Gegensatz zu nur 39% der Weibchen ist es zu einer Mikrofilarämie gekommen.
2. Bei allen *Goldhamstern* ist eine Mikrofilarämie aufgetreten. 87,2% der Tiere sind in Gruppe D eingeteilt.
3. Außer einem Tier sind alle *G. hirtipes* erfolgreich infiziert worden. 85% befinden sich in Gruppe E. Diese Tiere sind vor dem 7. Monat post inf. gestorben.
4. Wie in Kapitel 7 ausgeführt wird, besteht eine Immunität des Wirtes (Gruppe D) gegen Mf bei *M. libycus* und *Hamstern,* nicht aber bei *G. hirtipes.* Beim *Hamster* ist sie die Regel.
5. Zur Haltung von *D. viteae* im Laboratorium sind männliche *M. libycus* den anderen Wirten vorzuziehen, denn 44,2% der infizierten Männchen sind über Monate Mf-positiv (Gruppe E).

4. Lebensdauer und Verteilung der Filarien im Wirtskörper

4.1. Lebensdauer der Filarien

Filarien werden vom Wirtsorganismus nur während einer beschränkten Zeit toleriert. Durch Abkapselung und Lysis werden sie vernichtet. Der Beginn dieses Prozesses kann nach Sektionsbefunden beim *Hamster* ab 10. Monat, bei *M. libycus* ab 12. Monat post inf.

angesetzt werden. Allerdings wird bei einigen Tieren (Gruppe C) eine frühzeitige Abwehrreaktion festgestellt. Lebende Filarien können beim *Hamster* 15 Monate und beim *M. libycus* 16 Monate post inf. noch festgestellt werden. 2 *M. libycus* mit einer Mikrofilarämie von 19 Monaten lassen auf eine noch längere Lebensdauer schließen.

4.2. Verteilung der Filarien im Wirtskörper

Sektionsbefunde bei *M. libycus* und *Hamstern* nach artifizieller Infektion lassen erkennen, daß die Filarien vor allem im subcutanen Bindegewebe der Rückenseite sowie den Fascien der Rücken-, Steiß- und Oberschenkelmuskulatur gefunden werden (Abb. 7 a und c). Es ist fraglich, ob diese Ergebnisse durch den dorsal gelegenen Infestationsort bedingt sind; denn Autopsien von natürlich infizierten *M. persicus,* die 1967 von uns im Iran gefangen worden sind (vgl. Chamsa & Weiss, 1969), haben ergeben, daß deren Filarien ebenfalls die Dorsalseite und die Hinterextremitäten bevorzugt aufsuchen (Abb. 7 b). 80,4% aller

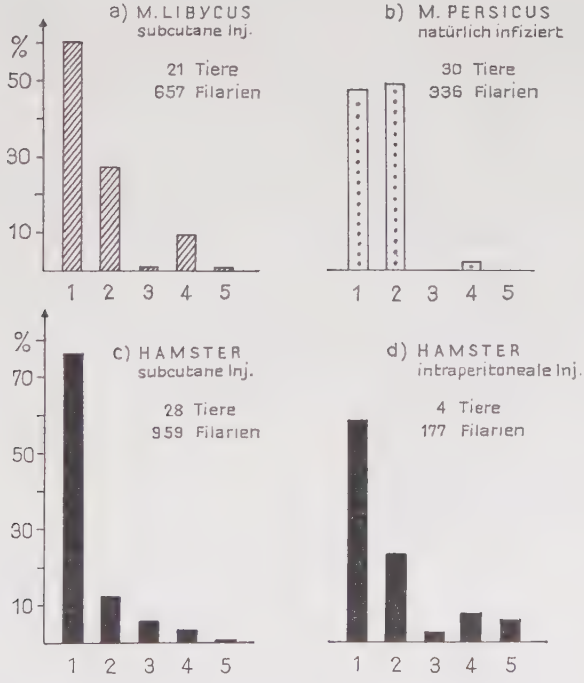

Abb. 7. Verteilung der Filarien im Wirtskörper. 1: dorsal, 2: Hinterextremitäten, 3: Vorderextremitäten, 4: ventral, 5: intraperitoneal.

Filarien sind in der Steißregion und an den Hinterbeinen gefunden worden. Nach intraperitonealen Injektionen mit infektiösen Larven in *Hamster* ergibt sich ein ähnliches Verteilungsbild wie nach subcutanen Injektionen (Abb. 7 d). Die Filarien der Art *D. viteae* bevorzugen offenbar bestimmte Körperregionen.

Bei Tieren mit starkem Filarienbefall werden öfters einzelne Filarien in der Peritonealhöhle gefunden. Es handelt sich dabei um eine Konkurrenzerscheinung, die zu einer Migration der Würmer in tiefere Muskelschichten und schließlich in die Peritonealhöhle führt [6]. Die Peritonealhöhle ist aber offenbar kein günstiges Milieu, denn 93,8% der Filarien vollziehen ihre weitere Entwicklung außerhalb der Bauchhöhle. Von den restlichen sind die meisten schon 4 Monate post inf. calzifiziert aufgefunden worden.

5. Die Entwicklungsraten

Durch die Anzahl injizierter L III pro Tier ist die Infektionsdosis bestimmt. Für Tiere, die vor der Abkapselung der Filarien seziert werden, läßt sich der Anteil der Larven, die sich zu adulten Würmern entwickelt haben, berechnen (= Entwicklungsrate). Tabelle 6 gibt darüber Auskunft.

Die mittleren Infektionsdosen (mL) pro Gruppe für den jeweiligen Wirt weichen nicht stark voneinander ab. Der Verlauf der Mikrofilarämie ist somit von der Infektionsdosis unabhängig.

Die mittlere Anzahl weiblicher Filarien pro Tier (mwF) ist für Gruppe A definitionsgemäß null. Diejenige für die Tiere der Gruppen B und C liegt unter 1. Interessant ist ein Vergleich der Gruppen D und E. Für *M. libycus* betragen die mwF 14,4% bzw. 15,4%, sind also beinahe gleich. Die kurze Mikrofilarämie der *M. libycus* in der Gruppe D kann deshalb nicht durch eine geringere Anzahl weiblicher Filarien erklärt werden. Beim *Hamster* ist die mittlere Anzahl weiblicher Filarien um 50% höher als der entsprechende Wert von *M. libycus*. Ein Vergleich mit der Gruppe E ist hier nicht möglich, da nur ein Einzelwert zur Verfügung steht.

Die mittlere Entwicklungsrate (mE) von *D. viteae* in der Gruppe A ist definitionsgemäß 0% und in den Gruppen B und C sehr niedrig. Die mE der Gruppen D und E sind vergleichbar. Sie müssen aber mit Vorsicht interpretiert werden, da große individuelle Schwankungen der Einzelwerte festzustellen sind. Die Extremwerte für *M. libycus* betra-

[6] BERTRAM (1958) hat für *Litomosoides carinii* ein ähnliches Konkurrenzphänomen beschrieben. Bei sehr starken Infektionen werden die Würmer in der Pleurahöhle im Wachstum beeinträchtigt. Einige wandern in die Peritonealhöhle aus, wo ihr Wachstum nicht oder nur wenig beeinflußt wird.

TABELLE 6

Die Entwicklungsraten

Gruppe	Tierart	Anzahl+Sex	mL	mwF	mF	mE in %
A	*M. libycus*	15 w	105	0	0	
		6 m	95	0	0	
		21	102	0	0	0
	G. hirtipes	1 w	60	0	0	0
B	*M. libycus*	3 w	90	< 1	3	
		5 m	90	< 1	2,6	
		8	90	< 1	2,8	3,1
C	*M. libycus*	5 w	75	< 1	2,4	
		1 m	100	0	0	
		6	80	< 1	2,0	2,5
	Hamster	1 w	65	1 *	13 *	
	G. hirtipes	2 w	60	1	2,5	
D	*M. libycus*	2 w	115	16,5	34,5	
		12 m	85	14,0	22,8	
		14	90	14,4	24,5	27,5
	Hamster	8 w	130	26,6	51,7	
		3 w **	110	24,0	52,6	
		10 m	90	17,0	31,6	
		21	109	21,7	42,0	38,5
E	*M. libycus*	2 w	105	19,5	42,0	
		12 m	108	14,8	26,4	
		14	108	15,4	28,6	26,5
	Hamster	1 m	125	27	37	
	G. hirtipes	4 w	65	8,3	12,8	
		3 m	90	22,7	41,3	
		7	76	14,4	25,0	32,9

* unbestimmte Anzahl calzifizierter Filarien.
** Infektion i.p.
mL durchschnittliche Infektionsdosis (L III/Tier).
mwF durchschnittliche Anzahl weiblicher Filarien pro Tier der Gruppe.
mF durchschnittliche Anzahl Filarien pro Tier der Gruppe.
mE mittlere Entwicklungsrate pro Gruppe.
w Weibchen.
m Männchen.

gen in der Gruppe D 6% und 47% und in der Gruppe E 3% und 78%, diejenigen für den *Hamster* in der Gruppe D 14% und 74%.

Da nicht alle Tiere jeder Gruppe zur Auswertung herangezogen werden können, ist die mE aller *M. libycus* und *Hamster* nicht berechnet worden. Drei Tatsachen sprechen aber dafür, daß im *Hamster* die mE gesamthaft höher ist als im natürlichen Wirt: 1. Die Infektionsrate des *Hamsters* ist höher (Kapitel 2), 2. 97,4% der *Hamster,* im Gegensatz zu nur 54,5% der *M. libycus,* gehören in die Gruppen D und E, und 3. die mE der *Hamster* der Gruppe D ist größer als der Vergleichswert des natürlichen Wirtes.

6. Beziehungen zwischen Mikrofilarien und den Wirten M. libycus *und* Hamster

Im Kapitel 3.2. sind Verlauf und Dauer der Mikrofilarämie bei den verschiedenen Wirten beschrieben. Mf werden über kürzere oder längere Zeit im Wirtsblut toleriert (vgl. Gruppen D und E). Auf das Phänomen einer Immunität gegen Mf soll im nächsten Kapitel eingegangen werden. Hier sind Untersuchungen zur Bestimmung der Überlebenszeit von Mf im Blut *reiner* Tiere dargestellt. Ebenso werden Versuche beschrieben über den Einfluß der Wirtsreaktion und der Milz auf die Länge der Mikrofilarämie.

6.1. Mikrofilarien im Wirtsorganismus

Worms et al. (1961) haben Angaben über die Verteilung von Mf in den verschiedenen Organen bei *M. libycus* veröffentlicht. 53,5% aller Mf sind im Blut, 37,1% in der Skeletmuskulatur, je 2,3% in Lunge und Nieren und 2,6% in der Herzmuskulatur zu finden. Die größten Mf-Dichten weisen Blut, Lunge und Herzmuskel auf. Im Herzmuskel ist sie sechsmal größer als in der Skeletmuskulatur. Die Autoren weisen darauf hin, daß die Mf nach dem Tode des Wirtes bis zur Fixierung der Organe ihren Aufenthaltsort ändern können. Ihre Resultate geben also nicht die genaue Verteilung der Mf im lebenden Tier wieder. Vor allem im linken Herzventrikel und im peripheren Blutkreislauf befinden sich unmittelbar nach dem Tode bedeutend mehr Mf. Eine Erklärung für diese Beobachtung haben Hawking (1954) und Hawking et al. (1964) gefunden. Sie haben gezeigt, daß unter Einfluß von Narkotika (Äther, Chloroform), erhöhtem Sauerstoffgehalt der Atemluft, Herabsetzung der Körpertemperatur sowie durch Injektion von Acetylcholin (1 mg/kg i.m.) Mf aus den Lungenkapillaren freigesetzt werden. Sie sind dann in erhöhter Zahl im peripheren Blutkreislauf zu

finden. Hawking & Clark (1967) haben die Bewegungen der Mf von *D. viteae* in der Lunge untersucht. Ihre dortige Ansammlung ist nicht durch eine Immobilisation bedingt. Vielmehr bewegen sich die Mf lebhaft innerhalb des präkapillären Netzwerkes der kleinen Arteriolen, so lebhaft, daß ein Weitertransport mit dem Blutstrom verhindert wird. Zur Erklärung der angeführten experimentellen Befunde postulieren die Autoren eine Sensibilität der Mf auf bestimmte Sauerstoffspannung und Temperatur. Erst eine Beeinträchtigung ihrer Eigenbewegung durch Narkose, zu hohen Sauerstoffgehalt oder verminderter Körpertemperatur des Wirtes führt zu einer Ausschwemmung und damit zu einer Erhöhung der Mf-Zahl im peripheren Blut.

Ich habe alle Blutproben narkotisierten Tieren entnommen. So ist ein Nachweis auch von wenigen Mf im Blut eher möglich.

6.2. Diaplacentäre Übertragung von Mikrofilarien

Mantovani & Jackson (1966) haben Mf der Art *Dirofilaria immitis* in der Amnionsflüssigkeit, im Foetus und im Blut neugeborener Hunde nachgewiesen. Diese Mf sind diaplacentär von der Mutter übertragen worden. Wir (Geigy et al., 1967) haben Angaben zur Übertragung von Mf der Art *D. viteae* von einem *M. libycus* auf seine Nachkommen veröffentlicht. Außerdem sind bei Feldforschungen im Iran diaplacentär infizierte *M. persicus* gefangen worden (Chamsa & Weiss, 1969).

Die Überlebenszeit der Mf läßt sich in diesem «Naturversuch» diaplacentär infizierter Foeten klar bestimmen [7]. Bei *M. libycus* dauert die transitorische Mikrofilarämie meist bis zu einem Alter von 15 bis 20 Wochen. 16 Tiere aus 5 Würfen sind untersucht worden. Die mittlere Länge der Mikrofilarämie beträgt für die männlichen Jungtiere 19 und für die weiblichen 18 Wochen. Bei einem kränklichen Männchen sind noch nach 29 Wochen Mf gefunden worden. Der Verlauf der Mikrofilarämie eines Wurfes von 5 Jungen, 4 Männchen und einem Weibchen zeigt Abbildung 8. Es sind die Mittelwerte der 5 Tiere sowie Minima und Maxima angegeben [8].

Beim *Hamster* habe ich ebenfalls eine diaplacentäre Übertragung von Mf festgestellt. Da kein Weibchen in der Zeit der hohen Mikrofilarämie geworfen hat, sind jeweilen nur wenige Mf übertragen worden. Aussagen über die Überlebenszeit in jungen Hamstern sind daher nicht möglich. Bei einem Jungen ist der Nachweis noch 5 Wochen nach Geburt gelungen.

---

[7] Die Augenvene kann von der 4. Woche nach Geburt an punktiert werden.

[8] Alle Werte sind auf ein mittleres Geburtsgewicht von 6,5 g umgerechnet worden, um die Gewichtszunahme der Tiere zu berücksichtigen.

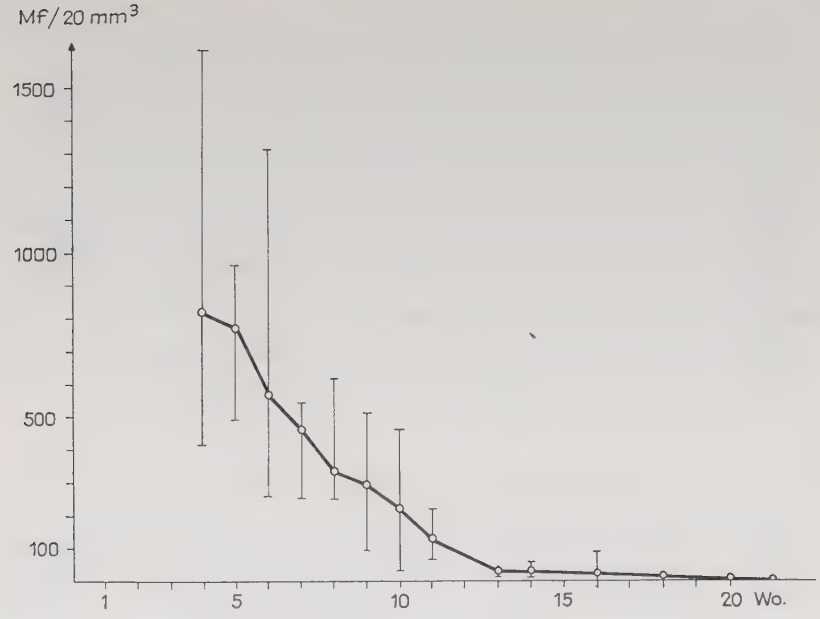

Abb. 8. Diaplacentäre Übertragung von Mf bei *M. libycus* (Wurf 560 a–e, 4 ♂, 1 ♀).

6.3. Injektionsversuche mit Mikrofilarien

Die ersten Transfusionsversuche mit Mf sind von FUELLEBORN (1929) am Hund durchgeführt worden. Seither haben verschiedene Autoren ähnliche Experimente unternommen.

HAWKING (1953) hat Mf der Art *Dirofilaria repens* intravenös in einen reinen Hund injiziert. Die Mf sind bis zum 68. Tag nach Transfusion nachgewiesen worden. Bei verschiedenen Transfusionsversuchen hat sich gezeigt, daß über 80% der injizierten Mf sofort verschwinden. Ihr Schicksal ist nicht bekannt.

Bei *M. libycus* und bei *Hamstern* sind keine intravenösen Injektionen durchführbar. Deshalb sind Mf subcutan injiziert worden.

6.3.1. *Mf-Injektionen in reine Tiere*

In Tabelle 7 sind die Ergebnisse der Injektionsversuche bei reinen *M. libycus* und *Hamstern* zusammengefaßt. Die Länge und der Verlauf der Mikrofilarämie ist von Art und Geschlecht des Wirtes abhängig.

Bei männlichen *M. libycus* sind die Mf 16–22 Wochen und bei den Weibchen 8–11 Wochen nachweisbar. Die Anzahl injizierter Mf ist bei den Männchen allerdings höher. Abbildung 9 zeigt den Verlauf der

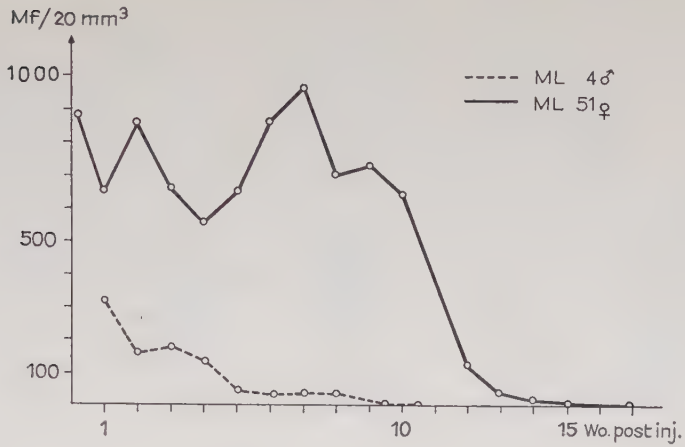

Abb. 9. Mf-Injektionen in reine *M. libycus.*

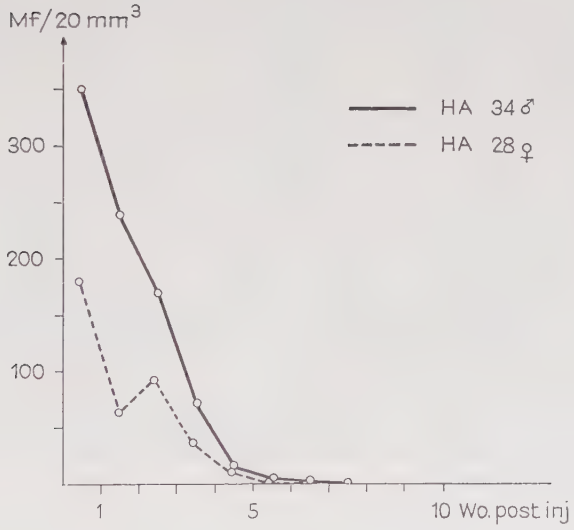

Abb. 10. Mf-Injektionen in reine *Hamster.*

Mikrofilarämie beim männlichen ML 4 und weiblichen ML 51 mit ähnlicher Injektionsdosis. Bei den Männchen nimmt die Zahl der Mf im Blut erst etwa 7 Wochen nach Injektion ab, bei den Weibchen dagegen bereits nach der zweiten Woche. Es wäre denkbar, daß weibliche Sexualhormone eine Rolle spielen, denn bei jungen *M. libycus* finden wir nach diaplacentärer Übertragung keine geschlechtsbedingten Unterschiede in der Überlebenszeit der Mf (Kapitel 6.2.).

TABELLE 7

Mf-Injektionen in reine *M. libycus* und *Hamster*

	Gew. bei Inj. in g	Anzahl injiz. Mf pro Gramm	max. Mf pro 20 mm³	Mikrofilarämie in Wochen
M. libycus				
♂ ML 4	63	16 000	880	16
♂ ML 9	85	40 000	900	17 † *
♂ ML 12	21	90 000	1 400	21
♂ ML 13	24	80 000	1 800	22
♀ ML 29	77	5 500	270	8
♀ ML 37	92	6 000	190	8
♀ ML 51	100	9 000	320	10
♀ ML 52	60	11 000	140	11
Hamster				
♂ HA 5	90	5 000	145	8
♂ HA 6	70	?	220	7
♂ HA 8	92	38 000	1 400	9
♂ HA 11	57	1 000	35	6
♂ HA 34	125	7 000	350	7
♀ HA 28	63	10 000	180	6
♀ HA 31	215	5 000	35	6
Ratte				
♂ RA 24	50	10 000	150	7

* 16. Woche: 1 Mf/20 mm³.

Beim inadäquaten Wirt, dem *Hamster*, ist eine im Vergleich zu *M. libycus* verkürzte Mikrofilarämie zu beobachten (Tabelle 7). Die Männchen sind während 6 bis 9, die Weibchen während 6 Wochen Mf-positiv (Abbildung 10).

Einem resistenten Wirt, einer *Laborratte*, sind ebenfalls Mf injiziert worden. Die Dauer der Mikrofilarämie ist mit derjenigen des *Hamsters* vergleichbar (Tabelle 7).

6.3.2. *Wiederholte Mf-Injektionen in reine Tiere*

Verändert sich die Wirt-Parasit-Beziehung im Verlauf der Mikrofilarämie? Ist die Überlebenszeit der Mf im Blut von der Immunlage des Wirtes abhängig? Um diese Frage abzuklären, sind nach der ersten Injektion weitere Mf injiziert worden. Über die Ergebnisse gibt Tabelle 8 Auskunft.

Bei *M. libycus* werden die Mikrofilarämien mit jeder weiteren Injektion kürzer und schwächer im Vergleich zur vorhergehenden (Abb. 11 a, b). Auf die 4. Injektion 8 Monate nach Versuchsbeginn reagiert der Wirt trotz einer hohen Injektionsdosis nur noch mit einer

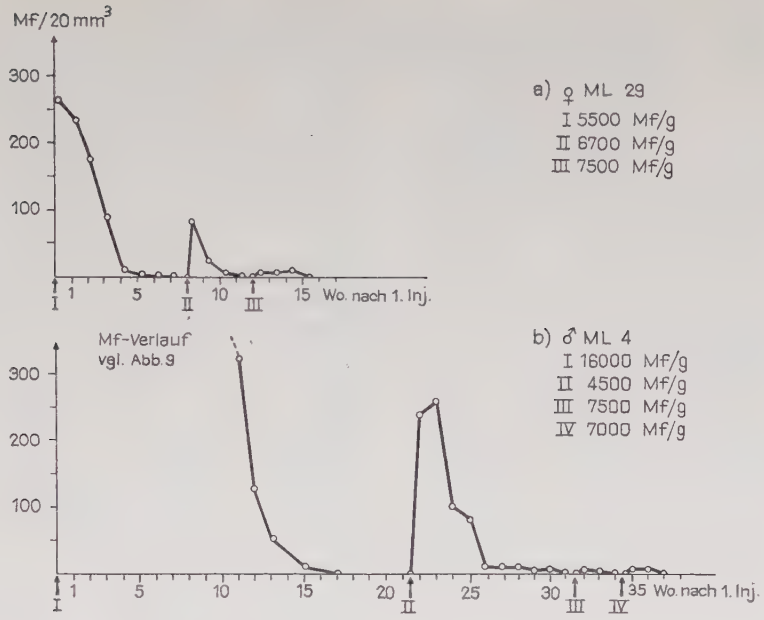

Abb. 11. Wiederholte Mf-Injektionen in reine *M. libycus*.

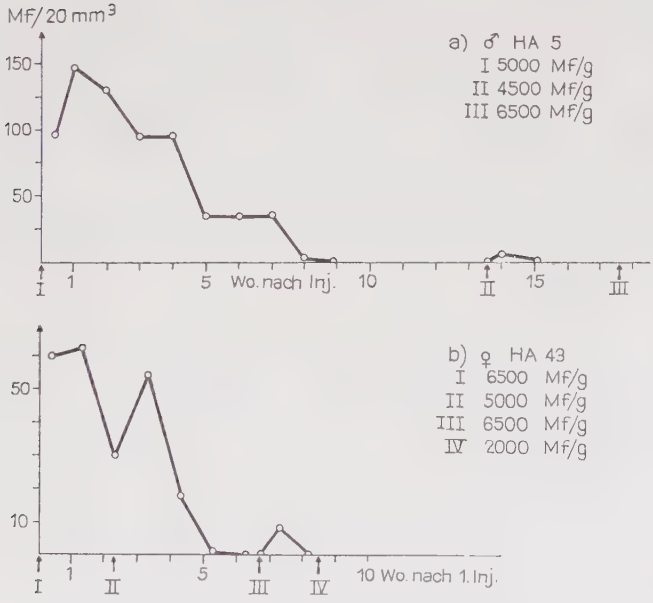

Abb. 12. Wiederholte Mf-Injektionen in reine *Hamster*.

TABELLE 8

Wiederholte Mf-Injektion in *M. libycus* und *Hamster*

	Injektion	Monate nach Versuchsbeginn	Anzahl injiz. Mf/g	max. Mf pro 20 mm³	Mikrofilarämie in Wochen
M. libycus	1.	0	16 000	960	16
♂ ML 4	2.	5	6 500	260	8
	3.	7	7 500	5	2
	4.	8	7 000	3	2
M. libycus	1.	0	5 500	270	8
♀ ML 29	2.	2	6 500	85	2
	3.	3	7 500	6	3
Hamster	1.	0	5 000	145	8
♂ HA 5	2.	3	4 500	10	1
	3.	4	6 500	0	0
Hamster	1.	0	38 000	1 420	9
♂ HA 8	2.	3	4 500	5	1
	3.	4,5	5 300	0	0
	4.	6,5	6 000	0	0
Hamster	1.	0	5 000	?	6
♀ HA 31	2.	1,5	5 500	50	5
	3.	3	4 000	0	0
Hamster	1.	0	6 300	60	2. Injekt. vor Ende
♀ HA 43	2.	0,5	4 500	55	3
	3.	1,5	6 500	8	1
	4.	2	2 500	0	0

sehr schwachen und kurzen Mikrofilarämie. Das Wirt-Parasit-Verhältnis hat sich geändert: Nur noch wenige Mf werden kurze Zeit im Blutkreislauf toleriert.

Beim *Hamster* tritt nach der ersten Mf-Injektion eine nachweisbare Immunreaktion auf. Antikörper werden mit der Immunofluoreszenzmethode 2 Wochen nach der ersten Injektion nachgewiesen. Der Antikörpertiter erreicht am Ende der ersten Mikrofilarämie ein Maximum (Weiss, 1969 b). Die zweite Injektion führt zu einer kürzeren Mikrofilarämie und bei der dritten (mindestens 3 Monate nach Versuchsbeginn) können keine Mf mehr im peripheren Blut gefunden werden (Abb. 12 a). Wird die zweite Injektion bereits 2 Wochen nach der ersten ausgeführt, so gelangen nach der 3. Injektion noch wenige Mf in das Blut. Nach der 4. Injektion, 2 Monate nach Versuchsbeginn, ist eine Mikrofilarämie ausgeblieben (Abb. 12 b).

Wong (1964) hat ähnliche Resultate bei wiederholten intravenösen Injektionen von Mf der Arten *Dirofilaria immitis* und *Brugia pahangi* bei Hunden erhalten.

6.3.3. *Der Einfluß der Milz auf die Mikrofilarämie*

Duke (1960) hat gezeigt, daß bei *Mandrillus*-Affen, die mit *Loa loa* infiziert worden sind, die Zahl der Mf im Blut nach Splenektomie erhöht wird. Er schließt daraus, daß Mf in der Milz zerstört würden. Hawking (1962) hat den Einfluß der Milz auf zirkulierende Mf verschiedener Filarienarten, unter anderen auch auf *D. viteae* untersucht. Bei drei infizierten *M. libycus* ist nach verschieden langer (!) Patenzzeit die Milz extirpiert und der Verlauf der Mikrofilarämie weiterhin beobachtet worden. Die erhaltenen Resultate sind jedoch nicht schlüssig. Die Versuchsanordnung ist für diese Fragestellung eher ungünstig, da die Reproduktionsfähigkeit der Filarien im Laufe der Patenzzeit kaum konstant bleibt. Er schreibt in der Diskussion: «In jirds infected with *Dipetalonema witei* the spleen may perhaps be sometimes active in removing microfilariae from the blood, although not to such a great extent as in monkeys with loa.» Die Frage nach der Rolle der Milz auf Mf der Art *D. viteae* ist offen geblieben.

Worms et al. (1961) haben bei ihrer Untersuchung über die Verteilung der Mf der Art *D. viteae* in *M. libycus* nur 0,3% aller Mf in der Milz gefunden. Die Mikrofilariendichte im Milzgewebe ist nur 3% von derjenigen im Blut. Dieser Befund spricht gegen eine hohe Zerstörungsrate von Mf in der Milz.

Wenn die Milz Mf zerstört, wäre bei Mf-Injektionen in splenektomierte Tiere eine längere Mikrofilarämie gegenüber den Kontrollen zu erwarten. Je 2 *M. libycus* und 4 *Hamstern* habe ich 8–18 Tage nach der Milzextirpation Mf injiziert. Eine Übersicht über die Auswirkungen gibt Tabelle 9. Die Mikrofilarämie ist bei den splenektomierten Tieren gegenüber den Kontrollen nicht verlängert (Abb. 13 a, b). Die Milz übt also nur einen unbedeutenden Einfluß auf das Wirt-Mf-Verhältnis aus.

6.3.4. *Einfluß zirkulierender Antikörper auf Mf*

Im Kapitel 6.3.2. sind die Wirt-Mf-Beziehungen nach wiederholten Mf-Injektionen dargestellt worden. Die immunologische Toleranz des Wirtes wird durch wiederholten Antigenreiz verändert. Bei diesen Versuchen sind nur Mf antigen wirksam. Im Gegensatz dazu ist bei Filarieninfektionen auch die Beeinflussung des Wirt-Mf-Verhältnisses durch die adulten Filarien zu berücksichtigen, die wie die Mf die Produktion von Antikörpern stimulieren. Als Antigen wirken Stoffwechselprodukte (Sekrete und Exkrete) sowie Zerfallsprodukte bei der einsetzenden Lysis (somatische Antigene). Allgemein wird angenommen,

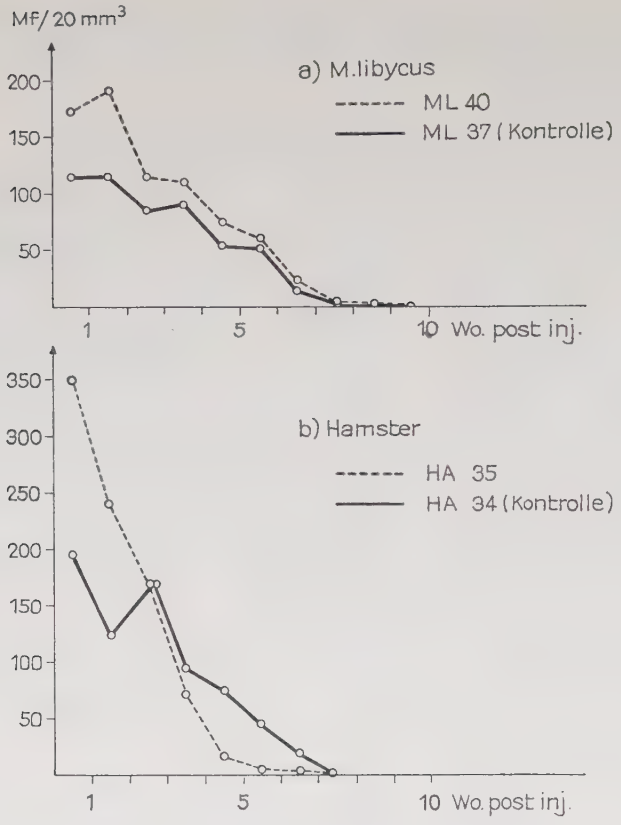

Abb. 13. Mf-Injektionen in splenektomierte *M. libycus* und *Hamster*.

daß die ersteren bei der Ausbildung einer Immunität eine Rolle spielen.

Die folgenden Experimente sollen zeigen, ob sich die Toleranz des Wirtes auf Mf durch Filarien beeinflussen läßt. Ich habe zu diesem Zweck den Wirten tote Filarien injiziert.

Bei den ersten Versuchen sind reinen Tieren 5, 4 und 2 Wochen vor der Mf-Injektion homogenisiertes oder lyophilisiertes Wurmmaterial intraperitoneal injiziert worden. Die Resultate sind in der Tabelle 10 aufgeführt. Die Länge der Mikrofilarämien ist im Vergleich zu den Kontrollen stark verkürzt. Bei *M. libycus* ML 14 und ML 15 sind nur wenige Mf während 1 bzw. 2 Wochen nachgewiesen worden, obwohl die Injektionsdosen mit derjenigen der Kontrolle ML 29 vergleichbar sind. Entweder ist es den Mf nicht gelungen, in den Blutkreislauf zu gelangen, oder aber sie sind sofort im Blut angegriffen und eliminiert worden. Den Verlauf der Mikrofilarämien der beiden *Hamster* HA 20

TABELLE 9

Die Mikrofilarämie von splenektomierten *M. libycus* und *Hamstern*

	Mf-Injektion nach Splenektomie in Tagen	Gewicht bei Injektion	Anzahl injizierter Mf/g	max. Mf pro 20 mm³	Mikrofilarämie in Wochen
M. libycus					
♂ ML 39	8	60	7 200	170	11
♀ ML 40	8	82	5 500	120	9
♀ ML 37	Kontrolle	92	5 800	190	9
Hamster					
♂ HA 35	10	100	7 200	200	7
♂ HA 36	10	105	7 000	95	7
♂ HA 34	Kontrolle	125	7 200	350	7
♀ HA 33	10	145	7 000	200	7
♀ HA 44	18	85	5 500	25	7

und HA 23, denen lyophilisierte Filarien bzw. Mf injiziert worden sind, und der Kontrolle zeigt Abbildung 14. Die Überlebenszeit der Mf im Blut ist wesentlich kürzer als bei der Kontrolle.

Daß die Antikörper, hervorgerufen durch einen Antigenstimulus mit toten Filarien, einen Einfluß auf die Mf im Blut haben, beweist der nächste Versuch (Tabelle 11). Drei Injektionen von homogenisierten

TABELLE 10

Mf-Injektionen in mit totem Wurmmaterial «immunisierte» *M. libycus* und *Hamster*

	3 i. p. Injektionen von je	Gewicht bei Injektion	Anzahl injizierter Mf/g	max. Mf pro 20 mm³	Mikrofilarämie in Wochen
M. libycus					
♂ ML 14	26/23/38 homogen. Fil.	115	5 500	23	2
♂ ML 15	27/30/32 homogen. Fil.	105	5 200	21	1
♀ ML 29	Kontrolle	77	5 200	270	8
Hamster					
♂ HA 20	15,7/32/25,2 mg lyophil. Fil.	128	5 000	80	1
♂ HA 23	9/6,5/12 mg lyophil. Mf	110	6 000	250	4
♀ HA 34	Kontrolle	125	7 000	350	7

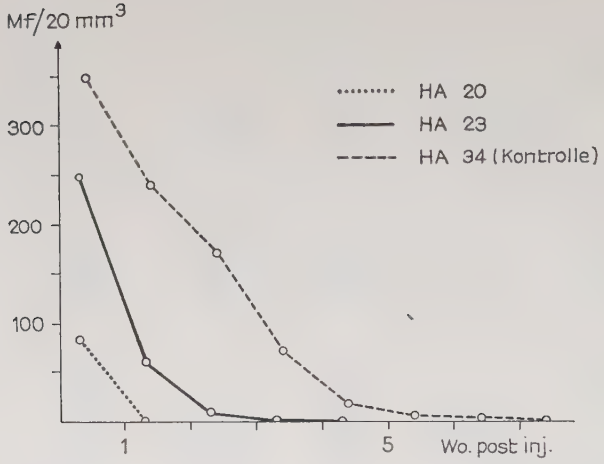

Abb. 14. Mf-Injektionen an mit totem Wurmmaterial «immunisierten» *Hamstern.*

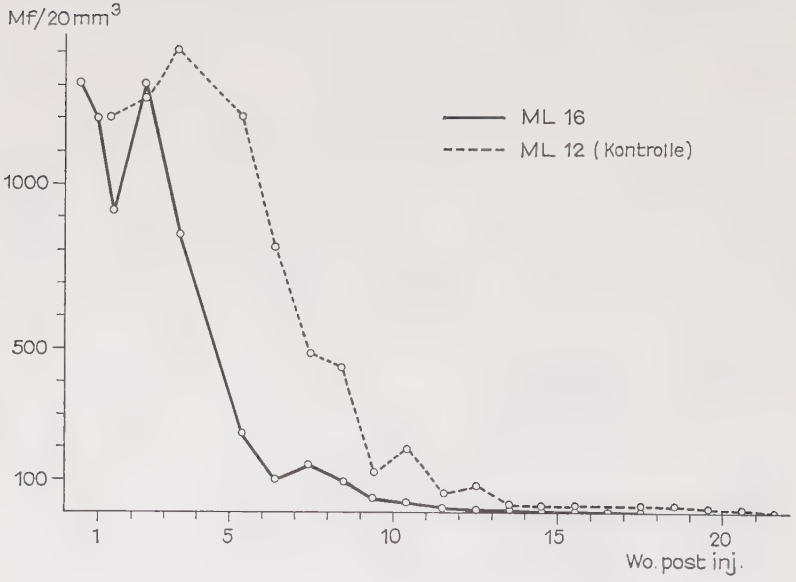

Abb. 15. Einfluß zirkulierender Antikörper auf den Verlauf der Mikrofilarämie bei *M. libycus.*

TABELLE 11

Mf-Injektion in mit totem Wurmmaterial «immunisierte» *M. libycus*

	3 i.p. Injektionen von	Gewicht bei Injektion	Anzahl injiz. Mf/g	max. Mf pro 20 mm³	Mikrofilarämie in Wochen
♂ ML 16	30/18/24 homog. Fil.	74	40 000	1 300	16
♂ ML 12	Kontrolle	21	90 000	1 400	21
♂ ML 13	Kontrolle	24	80 000	1 800	22

Filarien am Tier ML 16 sind 1 Woche vor sowie gleichzeitig mit der Mf-Injektion und 2 Wochen später ausgeführt worden. Der Antikörpertiter erreicht 1 Monat nach Mf-Injektion, d. h. nach Ausbildung einer hohen Mikrofilarämie, das Maximum. Abbildung 15 zeigt, daß zu diesem Zeitpunkt die Zahl der Mf im Blut stark reduziert wird. Allerdings werden noch bis zur 17. Woche wenige Mf gefunden.

Zusammenfassung und Besprechung von Kapitel 6

Die Ergebnisse der Mf-Injektionen in reine Tiere sowie diejenigen der diaplacentär infizierten Jungen zeigen, daß Mf im natürlichen Wirt, *M. libycus* (außer bei adulten Weibchen), lange überleben können. Beim inadäquaten Wirt, dem *Hamster,* hingegen ist die Überlebenszeit der Mf im Blut kürzer als im natürlichen Wirt.

Smithers (1968) ist in seinem Übersichtsartikel «Immunity to blood helminths» der Frage nachgegangen, wie es Mf und Schistosomen möglich ist, über lange Zeit im Wirtsblut zu überleben. Bleibt eine immunologische Antwort des Wirtes aus oder können die Parasiten eine Wirtsreaktion abwehren? Allgemein wird angenommen, daß Mf im natürlichen Wirt nur eine geringe Immunreaktion auslösen. Die Verwandtschaft von Wirt- und Parasitantigen wäre eine mögliche Erklärung (vgl. Damian, 1964, u. a.). Mantovani & Sulzer (1967) haben festgestellt, daß sich lebende Mf bei Immunofluoreszenztesten nicht als Antigen eignen. Die Oberfläche der Mf scheint antigen inert zu sein.

Meine Untersuchungen an reinen Tieren führen zu folgenden Schlüssen: Aus den Versuchen mit wiederholten Mf-Injektionen ist zu ersehen, daß sich die Wirtsreaktionen gegen Mf im Laufe einer Mikrofilarämie ändert. Bei *M. libycus* wird die Wirtstoleranz gegen Mf herabgesetzt. Beim *Hamster* ist eine Immunität gegen Mf ausgelöst worden. Eine immunologische Reaktion auf Mf bleibt demnach nicht aus, doch wirkt sie beim inadäquaten Wirt heftiger und wird schneller ausgebildet. Beim *Hamster* lassen sich im Gegensatz zum *M. libycus* bald

nach der Mf-Injektion Antikörper mit Hilfe der Immunofluoreszenzmethode nachweisen (Weiss, 1969 b). Der Schwellenwert zur Antikörperbildung scheint beim inadäquaten Wirt niedriger. Bei Tieren, in denen eine Immunreaktion durch Injektion von toten Filarien provoziert wird, ist die Überlebenszeit der Mf stark verkürzt. Daß Antikörper Mf angreifen und eliminieren können, haben auch die Versuche von Wong (1964) bewiesen: Nach Transfusion von Immunserum in Hunde mit einer hohen Mikrofilarämie wird die Zahl der Mf sofort stark reduziert. Daß Mf nicht von der Milz zerstört werden, zeigen die Experimente mit splenektomierten Tieren. Für *D. viteae* scheint die Milz keinen Einfluß auf die Kontrolle der Mikrofilarämie zu haben.

7. *Untersuchungen über die Immunität von* M. libycus *und* Hamster *gegenüber den Mikrofilarien*

Die Infektion eines Organismus durch einen Parasiten führt zu einer Reaktion des Wirtes. Wechselwirkungen zwischen Parasit und Wirt beeinflussen den Infektionsverlauf. Bei einer optimalen Adaptation des Parasiten an den Wirt wird sich ein Gleichgewicht einstellen, wobei der Wirt den Parasiten toleriert und der Parasit den Wirt möglichst wenig schädigt. Auf die Infektion mit *D. viteae* bezogen, ist dies bei den *M. libycus* der Gruppe E (vgl. Tabelle 4, Seite 225) der Fall, die Mf über lange Zeit tolerieren. Bei Tieren der Gruppe D erlischt die Mikrofilarämie nach 2–3 Monaten. Wie Tabelle 5 (Seite 232) zeigt, tolerieren 15,5% der *M. libycus* und 87,2% der *Hamster* darauf keine Mf mehr im Blut, obwohl noch adulte Filarien bis zu 15 Monaten post inf. überleben. Sobald sich die ersten Mf im Blut befinden, bilden diese Tiere eine Immunität aus und werden nach beendeter Mikrofilarämie als Immuntiere bezeichnet.

Nachdem im Kapitel 6 Experimente zur Wirt-Mf-Beziehung an reinen Tieren beschrieben sind, sollen hier Untersuchungen an Tieren der Gruppe D und an ihren Filarien aufgeführt werden. Anhand von Filarientransplantationen, Mf-Injektionen und *in vitro*-Versuchen sollen die beiden folgenden Fragen abgeklärt werden:

1. Wie kommt es, daß Mf vom Wirt nicht mehr toleriert werden?
2. Wie wirkt diese Immunreaktion auf die Wurmstadien?

Materialbedingt sind die meisten Untersuchungen an *Hamstern* durchgeführt worden.

7.1. Filarientransplantationen

Werden adulte Filarien 4–6 Monate nach Infektion in *reine* Tiere transplantiert, so kommt es in diesen zu einer Mikrofilarämie, die etwa

TABELLE 12

Filarientransplantationen in reine Tiere

	Gewicht bei Implantation in g	Anzahl implant. Filarien ♀	♂	max. Mf pro 20 mm³	Mikrofilarämie in Wochen	Sektionsbefund (post impl.)
M. libycus						
♀ Mk 12	60	22	59	3 200	28 †	Tier verbissen
♀ Mk 13	60	23	0	3 200	32	Alle Fil. calc. (8 Monate)
Hamster						
♀ Mk 1	80	15	11	160	8	4 ♀, 3 ♂ + calc. (2 Monate)
♀ Mk 2	80	32	27	230	7	7 ♀, 12 ♂ + calc. (3 Monate)
♀ Mk 3	80	22	0	20	9	3 ♀ + calc. (10 Monate)

3–4 Wochen nach Implantation ihre höchsten Werte erreicht. Bei den 3 *Hamstern* (Mk 1–3) sind Mf 7–9 Wochen, bei den beiden *M. libycus* (Mk 12 und 13) bis über 7 Monate nachweisbar (Tabelle 12).

In *M. libycus* Mk 13 sind nur weibliche Filarien implantiert worden. Die darauf einsetzende Mikrofilarämie ist lang und schwer. Daß Filarienweibchen auch ohne wiederholte Kopulation über lange Zeit reproduktionsfähig bleiben, hat WEBBER (1954) ebenfalls festgestellt[9].

Die *Hamster* reagieren auf die implantierten Filarien heftig. 2 Monate nach Implantation sind viele Filarien bereits lysiert oder calzifiziert. Bei Sektion am Ende der kurzen Mikrofilarämie sind noch lebende Filarien vorhanden. Die auffallend kurze Mikrofilarämie muß auf einer Immunisierung gegen Mf beruhen (vgl. Kapitel 7.3)[10].

Bei weiteren Transplantationsversuchen sind *Filarien aus Immuntieren* (Hamstern der Gruppe D, 5–6 Monate post inf.) *in reine Tiere* implantiert worden (Tabelle 13). Es zeigt sich, daß weibliche Filarien aus Immuntieren ihre Reproduktionsfähigkeit nicht eingebüßt haben; denn in allen Empfängertieren ist eine Mikrofilarämie, wenn auch nicht mit besonders hohen Werten, spontan aufgetreten.

[9] WEBBER (1954) hat bei seinen Transplantationsversuchen mit *Litomosoides carinii* beobachtet, daß nach Implantation ausschließlich befruchteter Weibchen oder auch Weibchen mit Männchen eine Mikrofilarämie in vergleichbarer Höhe und Dauer auftritt.

[10] SEN & BHATTACHARYA (1964) haben Filarien der Art *D. viteae* in weiße *Laborratten* implantiert. Am Ende einer 6–7wöchigen Mikrofilarämie sind bei Sektion keine Filarien mehr zu finden gewesen. Die Wirtsreaktion gegen Filarien ist bei diesem resistenten Wirt noch stärker als beim *Hamster*.

TABELLE 13

Transplantation von Filarien aus Immuntieren in reine Wirte

	Gewicht bei Implantation in g	Anzahl implant. Filarien ♀	♂	max. Mf pro 20 mm³	Mikrofilarämie in Wochen	Sektionsbefund (post impl.)
M. libycus						
♂ Mk 6	100	10	11	100	7	negativ (2 Monate)
♂ Mk 10	60	7	9	60	12 †	1 ♀, 1 ♂ (3 Monate)
♀ Mk 11	60	17	14	125	12 †	5 ♀, 2 ♂ (3 Monate)
Hamster						
♂ Mk 7	90	12	8	30	6	negativ (2 Monate)
♂ Mk 8	125	14	14	40	9	negativ (2,5 Monate)

7.2. Splenektomien von Immuntieren

Um die Auswirkungen einer Splenektomie bei Immuntieren zu untersuchen, sind vier Hamstern $1^1/_2$ bis $4^1/_2$ Monate nach beendigter Mikrofilarämie die Milz entfernt worden (Tabelle 14). Drei der Tiere sind Mf-negativ geblieben. Beim *Hamster* 563 D sind während 4 Wochen wenige Mf im Blut gefunden worden. Bei der Sektion habe ich eine schwere bakterielle Infektion in der Bauchhöhle festgestellt. Da auch die *Hamster* der Gruppe E (vgl. 3.2.5.) bakteriell infiziert gewesen sind, liegt es nahe, anzunehmen, daß beim *Hamster* 563 D nicht die Milzextirpation die kurze Mikrofilarämie verursacht hat. Offenbar wird durch eine zusätzliche Infektion die Abwehrreaktion des Wirtes gegen die Mf geschwächt.

TABELLE 14

Milzextirpation bei Immuntieren

	Splenektomie nach Ende der Mikrofilarämie in Monaten	max. Mf pro 20 mm³	Mikrofilarämie	Sektionsergebnis
Hamster				
♂ 29	$1^1/_2$	0	keine	nicht seziert
♂ 26	2	0	keine	23 ♀, 19 ♂
♂ 560 D	$4^1/_2$	0	keine	15 ♀, 8 ♂
♂ 563 D	$2^1/_2$	18	4 Wochen	33 ♀, 18 ♂

Diese Ergebnisse sprechen wie diejenigen in Kapitel 6.3.3. gegen eine Kontrolle der Mikrofilarämie durch die Milz.

7.3. Mf-Injektionen in Immuntiere

Außer in reine Tiere (vgl. Kapitel 6.3.2.) sind auch in Immuntiere Mf injiziert worden. Bei keinem der letzteren, einem *M. libycus* (ML 30) und sechs *Hamstern,* sind nach subcutaner Injektion Mf im Blut nachweisbar, selbst wenn bis zu 5,2 Millionen Mf appliziert und die ersten Blutproben $2^1/_2$, 6 und 12 Stunden nach Injektion kontrolliert worden sind (Tabelle 15). Die Injektionen sind $4^1/_2$ bis 14 Monate post inf., d. h. etwa $^1/_2$ bis 10 Monate nach beendigter Mikrofilarämie, ausgeführt worden. Dem *Hamster* Mk 2 (vgl. Tabelle 12) sind $2^1/_2$ Monate nach Implantation der Filarien Mf injiziert worden. Auch dieses Tier ist Mf-negativ geblieben.

TABELLE 15

Mf-Injektionen in Immuntiere

	Gewicht bei Injektion	Mf-Injektion Monate p. inf.	Mf-Injektion Anzahl in Mill.	Sektionsbefund (2-3 Wo. p. inj.) ♀	Sektionsbefund (2-3 Wo. p. inj.) ♂
M. libycus					
♂ ML 30	120	4,5	0,8	11	9
Hamster					
♂ HA 26	160	4	0,6	9	18
♂ HA 32	170	10,5	1,0	14	12
♂ HA 50	175	12,5	1,6	8	4
♀ HA 7	160	6,5	5,2	71	84
♀ HA 53	195	14	2,0	26	12 + calc.
♀ Mk 2	150	2,5 *	0,3	7	12 + calc.

* Nach Filarienimplantation.

Zum Vergleich ist einem *M. libycus der Gruppe E* ein Monat nach Abklingen seiner siebenmonatigen Mikrofilarämie 0,7 Millionen Mf (d. h. 4000 Mf/g) injiziert worden (Abbildung 16). Im Gegensatz zu den Immuntieren hat sich eine Mikrofilarämie entwickelt. Wie nach mehreren Injektionen in reine *M. libycus* (vgl. Kapitel 6.3.2.) werden auch hier nur noch wenige Mf über kurze Zeit im Blut toleriert. Das weist darauf hin, daß das Ende der Mikrofilarämie bei Tieren der Gruppe E durch eine Wirtsreaktion gegen die adulten Filarien bedingt

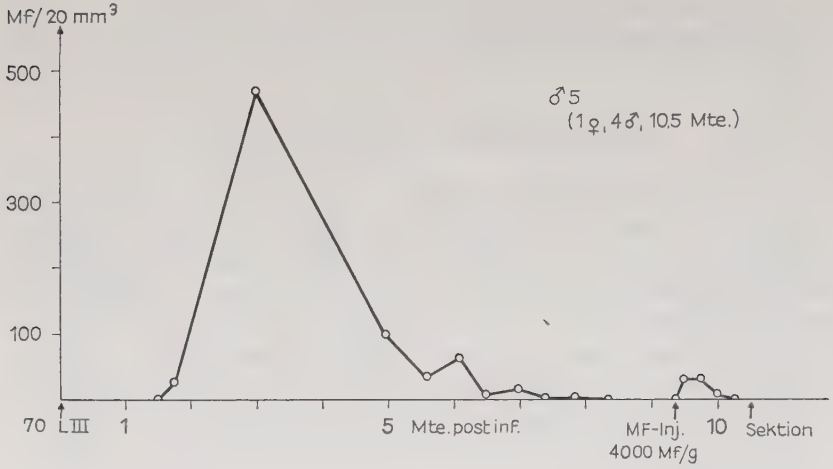

Abb. 16. Mf-Injektion in *M. libycus* der Gruppe E nach beendigter Mikrofilarämie.

ist. Sie wird in Calcification und Lysis manifest (vgl. Sektionsbefunde, Seite 232). Ob die Filarien durch andere Abwehrreaktionen, die den genannten Prozessen vorausgehen, beeinträchtigt werden, ist nicht untersucht worden.

7.4. Versuche mit Filarien *in vitro*

In vitro-Versuche mit Filarien sind u. a. von HAWKING (1954) und TAYLOR (1960) ausgeführt worden. Bis heute ist es nicht gelungen, Larvenstadien, Mf oder L III, außerhalb des Wirtes zu züchten. Adulte Filarien können während kurzer Zeit in Kulturmedium am Leben erhalten werden, wobei sie Mf produzieren. Kulturmedien verschiedener Zusammensetzung sind auf ihre Eignung zur Haltung adulter *Litomosoides carinii* von TAYLOR (1960) geprüft worden[11].

Das «Schistosomenmedium» (siehe S. 222) hat sich für *D. viteae* gut geeignet; die Filarien überlebten bis zu 3 Wochen. Mf sind in einzelnen Fällen bis zum 18. Tage abgegeben worden. Bis zu 15 000 Mf sind von einer Filarie pro Tag ausgestoßen worden. Am ersten Tag ist die durchschnittliche Anzahl produzierter Mf im Vergleich zu den folgenden Tagen niedriger (Tabelle 16). Der Grund für die verzögerte Mf-

[11] Die besten Resultate hat sie mit einem Kulturmedium aus Rattenserum und Medium «Parker 199» erhalten. Die Filarien haben bei 37° C 23 Tage überlebt und bis zum 18. Tag Mf abgegeben. Die mittlere Mf-Produktion pro Weibchen und Tag hat 8 300 betragen.

Abgabe mag in der Anpassung des Stoffwechsels der Filarien an das veränderte Milieu liegen.

Im Zusammenhang mit der Frage nach der Beeinflussung des Parasiten durch die Wirtsreaktion bei Immuntieren ist die Wirkung von Immunserum *in vitro* untersucht worden. Bei diesen Experimenten ist das Medium mit 10% Immunserum von Hamstern angereichert worden. Die Anzahl der abgegebenen Mf wird sofort stark vermindert (Tabelle 16).

TABELLE 16

Einfluß von Immunserum auf Mf-Abgabe *in vitro*

	Durchschnittliche Anzahl Mf/♀ (In Klammern: Anzahl ♀)			
	1. Tag	2. Tag	3. Tag	4. Tag
Medium + 10% Immunserum	40 (14)	40 (9)	75 (13)	280 (22)
Reines Medium	1 300 (35)	4 700 (37)	4 200 (23)	6 500 (5)

Medium mit Serum von nicht infizierten Hamstern hat auf die Reproduktionsfähigkeit der Filarien denselben Einfluß wie Medium ohne Zusatz.

Bei drei Versuchen sind weibliche Filarien nach ein- bzw. dreitägigem Aufenthalt in Medium mit 10% Immunserum in reines Medium zurückgeführt worden (Tabelle 17). Die Mf-Abgabe ist sofort wieder aufgenommen worden. Ähnliche Resultate hat Wong (1964) bei *in vitro*-Versuchen mit *Dirofilaria immitis* erhalten. Neben Reduktion der Mf-Produktion *in vitro* hat er gleichzeitig eine Erniedrigung des Stoffwechsels der Filarien feststellen können.

Filarien, die 10 Monate post inf. aus einem Immuntier in Medium überführt worden sind, haben sofort Mf abgegeben.

TABELLE 17

Einfluß von Immunserum auf Mf-Abgabe *in vitro*
(IM = Medium + 10% Immunserum)

	Anzahl Mikrofilarien pro weibliche Filarie					
	1. Tag	2. Tag	3. Tag	4. Tag	5. Tag	6. Tag
A	25	2 900	4 500	IM 250	10 000	
B	0	1 200	6 500	IM 0	2 400	
C	1 000	11 000	IM 200	IM 0	IM 50	13 500

Diese Versuche zeigen, daß sowohl kurzfristig *in vitro,* wie auch langfristig *in vivo,* die Reproduktionsfähigkeit der weiblichen Filarien nicht irreversibel beeinträchtigt ist.

Zusammenfassung und Besprechung von Kapitel 7

Eine erworbene Immunität gegen Mf der Art *Litomosoides carinii* nach natürlicher Infektion eines inadäquaten Wirtes, der *Laborratte,* ist von RAMAKRISHNAN et al. (1962) beobachtet worden. Kein Autor hat dieses Phänomen beim natürlichen Wirt, der Baumwollratte, bis heute beschrieben. Allgemein wird angenommen, daß Mf vom natürlichen Wirt toleriert werden, und daß erst eine Abkapselung der Filarien die Mikrofilarämie zum Erlöschen bringt.

Aus der vorliegenden Arbeit geht hervor, daß bei Infektion mit *D. viteae* auch der natürliche Wirt, *M. libycus,* gegen Mf immun werden kann (vgl. Gruppe D in Kapitel 3.2.4.). Beim inadäquaten Wirt, dem Goldhamster, bildet die aktive Unterdrückung einer Mikrofilarämie die Regel. Nur wenige Tiere, deren Immunabwehr durch zusätzliche Infektion geschwächt ist, haben Mf länger als 3 Monate im Blut toleriert.

Eine Immunität gegen Mf wird in allen Fällen erst nach einer transitorischen Mikrofilarämie erworben. Welche Antigenreize sind für ihre Ausbildung bedeutend? Zwei Hypothesen sind denkbar:

1. Die verantwortlichen Antigenreize fallen in die Präpatenzzeit, in der sich die Larven III zu adulten Filarien entwickeln. Die Wirtsreaktion kommt jedoch erst zur Geltung, wenn bereits die ersten Mf ausgestoßen worden sind.

2. Erst die zirkulierenden Mf rufen die Immunreaktion des Wirtes hervor.

Wie es bei einzelnen *M. libycus* zu einer Immunität gegen Mf kommt, ist nicht geklärt. Beim *Hamster* läßt sich Genaueres aussagen. Die erste Hypothese wird mit folgender Feststellung widerlegt: Nach Implantation von adulten Filarien in reine Hamster resultiert nur eine kurze Mikrofilarämie, die auf eine Immunreaktion zurückgeführt werden kann (vgl. 7.1. und 7.3.). Für die zweite Hypothese spricht daß nach wiederholten Injektionen von lebenden Mf alle *Hamster* gegen Mf immun werden. Diese Resultate führen zum Schluß, daß Mf der Art *D. viteae* und ihre Stoffwechselprodukte eine Immunität des *inadäquaten Wirtes* verursachen.

WENK & HEIMBURGER (1967) haben die Empfänglichkeit des *Goldhamsters* auf *Litomosoides carinii* untersucht und sind zu folgenden Ergebnissen gelangt: Nach Infektion von adulten *Hamstern* ist nur bei

23% aller Tiere eine vorübergehende Mikrofilarämie aufgetreten. Werden aber reinen Hamstern adulte Filarien implantiert, so resultieren Mikrofilarämien, die zum Teil lang angedauert haben. Die Autoren kommen daher zum Schluß: «Die eingeschränkte Empfänglichkeit des Goldhamsters gegenüber einer natürlichen Infektion durch die Haut beruht offenbar auf Wirkungen, die den Wirt während der Invasionsphase der Infektion, d. h. der Wanderung der mL (metazyklische Larven) durch das lymphatische System, treffen. Die Beantwortung dieser Reize durch den Wirt erfolgt jedoch erst, wenn die mL bzw. L4 zu aW (adulte Würmer) herangewachsen sind und bereits Mikrofilarien auszustoßen beginnen.» Damit vertreten sie die erste Hypothese. Ob bei der Infektion mit *L. carinii* andere Faktoren die Wirtstoleranz auf Mf beeinflussen als bei *D. viteae* wäre denkbar, möglicherweise bedingt durch den verschiedenartigen Infektionsverlauf während der Präpatenzzeit.

Welche Ursachen führen dazu, daß Immuntiere Mf-negativ werden? Zwei grundsätzlich verschiedene Mechanismen sind denkbar: Die Filarien produzieren keine Mf mehr, oder aber die ausgestoßenen Mf werden vom Wirt sofort zerstört. *In vitro*-Versuche und Transplantationen von Filarien in reine Tiere haben gezeigt, daß Filarien aus Immuntieren nicht irreversibel geschädigt sind. Die Entwicklung der Mf ist von TERRY et al. (1961) beschrieben worden. Zeitangaben über die Entwicklungsdauer fehlen. Man darf aber mit Sicherheit annehmen, daß die Embryogenese einige Tage dauert [12]. Da die Filarien aus Immuntieren spontan mit Ausstoßen von Mf beginnen (vgl. Kapitel 7.4.), muß man annehmen, daß die Embryogenese im Immuntier nicht völlig eingestellt war. Bei Zugabe von Immunserum wird *in vitro* die Mf-Produktion sehr stark reduziert. Ob und wie stark sie auch *in vivo* im Immuntier beeinträchtigt ist, müßte mit Hilfe von histologischen Untersuchungen festgestellt werden.

JACKSON (1960) hat bei *Nippostrongylus muris,* die *in vitro* in markiertem Immunserum gehalten worden sind, Präzipitate an den verschiedenen Körperöffnungen der Würmer gefunden. Es wäre denkbar, daß ein Präzipitationspfropf an der Vaginalöffnung der Filarien ein Austreten der Mf verhindert.

Wenn auch die Mf-Produktion der Filarien nicht völlig eingestellt ist, so verfügt ein Immuntier doch über starke Abwehrkräfte, die eine Mikrofilarämie unterdrücken können. Mf-Injektionen in Immuntiere (vgl. Kapitel 7.3.) zeigen, daß selbst große Mengen injizierter Mf zerstört werden. Wie Mf vom Organismus angegriffen und eliminiert

[12] Nach HAWKING (1954) beträgt die Anzahl der in einem reifen *L. carinii*-Weibchen gefundenen Eier und Mf zwischen 60 000 und 100 000. Aus einer mittleren täglichen Produktionsrate von 15 000 Mf schließt er auf eine Entwicklungszeit der Mf von 5–6 Tagen.

werden, ist im einzelnen unbekannt. Agglutinine im Immunserum von Hunden sind von YUTUC (1958) und WONG (1964) nachgewiesen worden.

Literatur

BAIN, O. (1967). Biologie larvaire et mécanisme de transmissions de la filaire *Dipetalonema viteae*. – Ann. Parasit. hum. comp. *42*, 211–267

BALTAZARD, M., CHABAUD, A. G., MODIFI, CH. & MINOU, A. (1953). Une nouvelle filaire « de laboratoire ». – Ann. Parasit. hum. comp. *28*, 387–391

BERTRAM, D. S. (1958). Some factors affecting microfilarial density and pathogenicity in experimental epidemiology of an animal filarioid infection. – Proc. VI Int. Congr. of trop. Med. and Mal. Vol. II, Lisboa 1958, pp. 437–443

CHABAUD, A. G. (1952). Le genre *Dipetalonema* Diesing 1861. Essai de classification. – Ann. Parasit. hum. comp. *27*, 250–285

CHABAUD, A. G. (1954). Sur le cycle évolutif des spirurides et de nématodes ayant une biologie comparable. XVIII – *Dipetalonema blanci*, Chabaud 1952. – Ann. Parasit. hum. comp. *29*, 238–249

CHAMSA, M. & WEISS, N. (1969). Epidemiologische Untersuchungen an einer Nagetierfilariose (*Dipetalonema viteae*, Krepkogorskaja 1933) im Iran. – Acta trop. *26*, 370–375

DAMIAN, R. T. (1964). Molecular mimicry: Antigen sharing by parasite and host and its consequences. – Amer. Nat. *98*, 129–149

DERLYATKO, K. L. (1962). Filariasis in *Meriones erythrourus* in South Tadzhikistan. – Zool. Zhurnal *41* (5), 755–758

DUKE, B. O. L. (1960). Studies on loiasis in monkeys. II: The population dynamics of the microfilaria of *Loa* in experimently infected drills *(Mandrillus lencophaeus)*. III: The pathology of the spleen in drills *(Mandrillus lencophaeus)* infected with *Loa*. – Ann. trop. Med. Parasit. *54*, 141–146

FÜLLEBORN, F. (1929). In Kolle-Wassermanns Handbuch der pathogenen Mikroorganismen, 3. Auflage, Bd. 6, p. 1096. – Jena: Fischer

GEIGY, R., AESCHLIMANN, A. & WEISS, N. (1967). Transplacentäre Übertragung von Mikrofilarien der Art *Dipetalonema witeae* bei *Meriones libycus*. – Acta trop. *24*, 266–267

HAWKING, F. (1953). The periodicity of microfilariae. III. Transfusion of microfilariae into a clean host. – Trans. roy. Soc. trop. Med. Hyg. *47*, 82–83

HAWKING, F. (1954). The reproductive system of *Litomosoides carinii*, a filarial parasite of the cotton rat. III. The number of microfilariae produced. – Ann. trop. Med. Parasit. *48*, 382–385

HAWKING, F. (1962). The role of the spleen in controlling the number of microfilariae *(Dirofilaria immitis, D. repens, Litomosoides carinii* and *Dipetalonema witei)* in the blood. – Ann. trop. Med. Parasit. *56*, 168–172

HAWKING, F., ADAMS, W. E. & WORMS, M. J. (1964). The periodicity of microfilariae. VII. The effect of parasympathic stimulants upon the distribution of microfilariae. – Trans. roy. Soc. trop. Med. Hyg. *58*, 178–194

HAWKING, F. & CLARK, J. B. (1967). The periodicity of microfilariae. XIII. Movements of *Dipetalonema witei* in the lungs. – Trans. roy. Soc. trop. Med. Hyg. *61*, 817–826

JACKSON, G. J. (1960). Fluorescent antibody studies of *Nippostrongylus muris* infections. – J. inf. Dis. *106*, 20–36

KREPKOGORSKAJA, T. A. (1933). Beitrag zur Fauna der Nematoden aus *Rhombomys opimus* Licht. aus Kasakstan. – Zool. Anzeiger *102*, 87–91

LAMBERT, C. R. (1966). Nouveau traitement des schistosomiases et de l'amibiase, le CIBA 32644-Ba. – Acta trop. *23,* 1–80

MANTOVANI, A. & JACKSON, R. F. (1966). Transplacental transmission of microfilariae of *Dirofilaria immitis* in the dog. – J. Parasitol. *52,* 116

MANTOVANI, A. & SULZER, A. J. (1967). Indirect fluorescent antibody technique for diagnosis of canine filariasis. – Amer. J. vet. Res. *28,* 351–354

RAMAKRISHNAN, S. P., SINGH, D. & KRISHNASWAMI, A. K. (1962). Evidence of acquired immunity against microfilariae of *Litomosoides carinii* in albino rats with mite-induced infection. – Ind. J. Malariol. *16,* 263–268

SADUN, E. H. (1948). Relation to the gonadal hormones to the natural resistence of chickens and to the growth of the nematode. – J. Parasit. *34,* Suppl. p. 18.

SADUN, E. H. (1951). Gonadal hormones in experimental *Ascaridia galli* infections in chickens. – Exp. Parasit. *1,* 70–82

SEN, A. B. & BHATTACHARYA, B. K. (1964). Studies on *Dipetalonema witei* infection in albino rats. – Ind. J. Helminth. *16,* 142–150

SIMPSON, G. G. (1945). The principles of classification and a classification of mammals. – Bull. amer. Mus. nat. Hist. *85,* 1–350

SMITHERS, S. R. (1968). Immunity to blood helminths. In: "Immunity to Parasites". Ed. by A. E. R. TAYLOR, pp. 55–66. – Oxford: Blackwell Sci. Publ.

TAYLOR, A. E. R. (1960). Maintenance of Filarial Worms *in vitro*. – Exp. Parasit. *9,* 113–120

TERRY, A., TERRY, R. J. & WORMS, M. (1961). *Dipetalonema witei,* filarial parasite of the jird,*Meriones libycus*. II. The reproductive system, gametogenesis and development of the microfilaria. – J. Parasit. *47,* 703–712

TODD, A. C. & HOLLINGSWORTH, K. P. (1952). Host sex as a factor in development of *Ascaridia galli*. – Exp. Parasit. *1,* 303–304

WEBBER, W. A. F. (1954). The reproductive system of *Litomosoides carinii,* a filarial parasite of the cotton rat. II. The frequency of insemination. – Ann. trop. Med. Parasit. *48,* 375

WEISS, N. (1969 a). Untersuchungen über eine Immunität gegen Mikrofilarien der Art *Dipetalonema viteae* bei *Meriones libycus* und beim *Hamster*. – Rev. Suisse Zool. *76,* 750–760

WEISS, N. (1969 b). Serologische Untersuchungen an mit *Dipetalonema viteae* infizierten Hamstern mit Hilfe der Immunofluoreszenzmethode. – Acta trop. *26,* 179–180

WENK, P. & HEIMBURGER, L. (1967). Infektionsversuche mit der Baumwollrattenfilarie *Litomosoides carinii* Chandler 1931 (Filariidee) bei inadäquaten Wirten. – Z.Parasitenk. *29,* 282–297

WHARTON, D. R. A. (1947). Pathological changes in natural and experimental filariasis in the cotton rat. – J. inf. Dis. *80,* 307–318

WONG, M. M. (1964). Studies on microfilaremia in dogs. II. Levels of microfilaremia in relations to immunologic responses of the host. – Amer. J. trop. Med. Hyg. *13,* 66–77

WORMS, M. J., TERRY, R. J. & TERRY, A. (1961). *Dipetalonema witei,* filarial parasite of the jird, *Meriones libycus*. I. Maintenance in the laboratory. – J. Parasit. *47,* 963–970

YEH, L. S. (1957). On a filarial parasite *Deraiphoronema freitaslenti* n. sp. from the giant ant eater *Myrmecophaga tridactyla* from British Guiana and a proposed reclassification of *Dipetalonema* and related genera. – Parasitology *47,* 196–205

YUTUC, L. M. (1958). Agglutination of microfilariae in the blood of the dog infected with *Dirofilaria immitis*. – Proc. VI Int. Congress on trop. Med. and Malaria, Vol. II, Lisboa 1958, pp. 484–487

Summary

Dipetalonema viteae (D. witei) is a filarial parasite of the jird *Meriones libycus*. The course of the infection in the natural host was compared with that in two laboratory animals, namely *Gerbillus hirtipes* and *Mesocricetus auratus* (golden hamster). In particular, the development and duration of the microfilaraemia as well as the distribution and life span of the adult filariae in this hosts were examined. The interrelationship between host and microfilariae was studied by injecting microfilariae (Mf) into clean hamsters and jirds, some of which had been splenectomized before. The short duration of microfilaraemia in some of the infected jirds and most of the hamsters combined with the longevity of the adult filariae suggest an acquired immunity against Mf. Evidence for this was provided by the results of filarial transplantation, repeated Mf-injections and maintenance of adult filariae *in vitro*.

After subcutaneous inoculation of 60–120 infective larvae – obtained by dissecting ticks *(Ornithodorus)* – adult worms developed in 69 out of 90 *M. libycus*, 35 of 36 *G. hirtipes* and in all of the 39 *M. auratus*. As regards *M. libycus*, the infection rate was greater for males than for females.

39% of the female and 65.4% of the male *M. libycus* as well as 100% of *M. auratus* and 97.3% of *G. hirtipes* showed a microfilaraemia. After 2–3 months patent microfilaraemia, no more Mf were found in the peripheral blood of 15.5% of the *M. libycus* and 87.2% of the *M. auratus*, although at autopsy in each case more than one live female filaria was recovered (cf. table 4, group D). An active supression of microfilaraemia in the hamster is the rule (only 4 of 39 hamsters, affected at the same time by bacterial infections, tolerated Mf for more than 3 months). The same immunological response was observed after repeated subcutaneous injections of live Mf or implantation of adult filariae into clean hamsters.

After disappearance of Mf, immune hosts still tolerated adult filariae. Living worms were recovered up to 15 months after infection and were still able to produce Mf when maintained *in vitro* or implanted into clean hosts. However, the production of Mf *in vitro* decreased considerably after addition of 10% immune sera to the culture medium. In immune hosts, subcutaneous injection of Mf never gave rise to microfilaraemia, although great numbers of Mf (up to 30 000 per g) had been injected (animals of group D).

Transplacental transmission could be demonstrated in *M. libycus* as well as in hamsters.

After subcutaneous injection of Mf into clean jirds, the microfilariae survived more than 16 weeks in male and less than 11 weeks in female hosts. Microfilaraemia in hamsters persisted only for 6 to 9 weeks. After repeated injections of Mf, the number of Mf in the peripheral blood as well as the survival time decrease more and more in the case of jirds, whereas hamsters show complete immunity after the second injection. This may suggest, that live Mf react as antigen. The threshold value of antigen for antibody formation is reduced in the unnatural host. If an immunological response had been stimulated previously by i.p. injection of homogenised filariae or Mf, the life span of the Mf was considerably reduced. Experiments carried out in the same way on splenectomized animals gave identical results. This seems to prove, that the spleen is not involved in the destruction of Mf of *D. viteae*.

Résumé

L'étude de la filariose du rongeur à *Dipetalonema viteae (D. witei)* a été réalisée chez son hôte naturel, *Meriones libycus*, et chez deux animaux de labora-

toire, *Gerbillus hirtipes* et *Mesocricetus auratus* (hamster doré). Cette étude a porté principalement sur la longévité et la répartition des filaires chez l'hôte définitif, et sur l'intensité et la durée de la microfilarémie. Les relations hôte-parasite ont également été étudiées chez *M. libycus* et chez le hamster, par injection de microfilaires (Mf) chez un certain nombre d'animaux non infestés et en partie splénectomisés. Après une courte microfilarémie, des essais *in vitro*, des transplantations de filaires et des injections de Mf ont permi de mettre en évidence une immunité acquise chez quelques *mérions* et chez la plupart des *hamsters*.

Après injection de larves infectantes, des filaires adultes ont été retrouvées chez 69/90 *M. libycus*, 35/36 *G. hirtipes* et chez les 39 *hamsters*. Chez *M. libycus* le taux d'infection des mâles est supérieur à celui des femelles.

La microfilarémie est présente chez 39 % des *mérions* femelles, 65,3 % des mérions mâles, 100 % des *hamsters* et 97,3 % des *gerbilles*. Cette microfilarémie a disparu après 2 à 3 mois chez 15,5 % des *mérions* et 87,2 % des *hamsters*, bien que la dissection ait montré qu'il reste toujours plus d'une filaire femelle vivante (groupe D, tableau 4). Cette immunité qui semble être la règle chez le *hamster* (les 4 hamsters qui n'ont pas présenté la réaction immunitaire étaient atteints d'infections bactériennes) apparait également après des injections répétées de Mf ou des implantations de filaires adultes chez des hôtes non infestés au préalable. Après disparition de la microfilarémie, les filaires adultes vivantes ont pu être retrouvées dans certain cas jusqu'à 15 mois après l'infestation. Ces filaires sont encore capables de produire des Mf *in vitro* ou chez l'animal, mais cette production est considérablement réduite dans les milieux de culture enrichis à 10 % de sérums immuns (groupe D). Par ailleurs aucune microfilarémie n'a pu être constatée après injection sous-cutanée de Mf chez les *hamsters* du groupe D.

La transmission transplacentaire des Mf a été démontrée chez les *mérions* et chez les *hamsters*.

Chez les *mérions* non infestés, les Mf injectées par voie sous-cutané ont survécu plus de 16 semaines chez les mâles et moins de 11 semaines chez les femelles. Chez le *hamster* la persistance de la microfilarémie est réduite à 6–9 semaines. Après des injections répétées de Mf, la microfilarémie devient de plus en plus faible et de plus en plus brève chez le *mérion*, tandis que chez le *hamster* une immunité apparait après la deuxième injection. La survie des Mf est considérablement réduite chez les animaux préparés par des injections intrapéritonéales de filaires ou de Mf mortes. Les essais réalisés sur des animaux splénectomisés ont donné des résultats identiques, ce qui tend à prouver que la rate ne joue aucun rôle dans la destruction des Mf de *D. viteae*.

Curriculum vitae

Am 26. März 1944 wurde ich als Sohn des Hans und der Gertrud Weiss-Hüser in Basel geboren. Ich durchlief die Primarschule und das Mathematisch-Naturwissenschaftliche Gymnasium in Basel, wo ich 1963 die Maturitätsprüfung bestand. Im gleichen Jahr immatrikulierte ich mich an der Philosophisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität Basel zum Studium der Zoologie im Hauptfach, Chemie, Botanik und Bakteriologie-Hygiene im Nebenfach.

Ich besuchte Vorlesungen und Kurse der Herren Professoren Annaheim, Erlenmeyer, Fallab, Flückiger, Freyvogel, Geiger-Huber, Geigy, Grob, Löffler, Nüesch, Portmann, Schenkel, Tamm, Tomcsik, Zoller und den Herren Dozenten Aeschlimann, Honegger, Jenny, Lang, Reiff und Roth.

Seit September 1966 war ich Doktorand am Schweizerischen Tropeninstitut und 1968–69 Assistent an der tropenmedizinischen Abteilung. Die vorliegende Dissertation entstand unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. R. Geigy und Herrn PD Dr. A. Aeschlimann.

1969–70 habe ich meine Studien unterbrochen und eine Assistenzstelle im Rahmen des «Projet Mangoky» in Madagaskar übernommen.